



# Aproximaciones bioquímicas y celulares a la fisiopatología de la Leucoencefalopatía Megalencefálica

Tania López Hernández

**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](http://www.tdx.cat)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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](http://www.tdx.cat)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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](http://www.tdx.cat)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.



Programa de doctorado de BIOMEDICINA

Bienio 2008-2011

# **Aproximaciones bioquímicas y celulares a la fisiopatología de la Leucoencefalopatía Megalencefálica**

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Raúl Estévez Povedano en la Unidad de Fisiología del Departamento de Ciencias Fisiológicas II de la Universitat de Barcelona

Tania López Hernández

Dr. Raúl Estévez Povedano

Memoria presentada por Tania López Hernández  
Para optar al grado de  
Doctor por la Universitat de Barcelona



***A mi papito del alma,  
por protegerme y acompañarme desde el Universo.***

***A mi querida mamá,  
por cuidarme y apoyarme en la Tierra.***

*Confía en el tiempo,  
suele dar dulces salidas a  
muchas amargas dificultades.*

*Miguel de Cervantes Saavedra*





***Caminante, son tus huellas el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino, se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino, y al volver la vista atrás se  
ve la senda que nunca se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino sino estelas en la mar.***

***Antonio Machado***

***Vivir no es sólo existir, sino existir y crear,  
saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar.  
Descansar, es empezar a morir.***

***Gregorio Marañón***



# **ÍNDICE GENERAL**

*Aquél que tiene un porqué para vivir se puede enfrentar a todos los "cómos".*

*Friedrich Nietzsche*



# ÍNDICE GENERAL

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

<b><u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	<b>1</b>
<b>1. <u>ENFERMEDADES GENÉTICAS ASOCIADAS A DEFECTOS EN LA MIELINA: LAS LEUCODISTROFIAS.</u></b>	<b>4</b>
<b>1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCODISTROFIAS.</b>	<b>5</b>
<b>2. <u>LEUCOENCEFALOPATÍA MEGALENCEFÁLICA CON QUISTES SUBCORTICALES (MLC).</u></b>	<b>7</b>
<b>2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.</b>	<b>7</b>
<b>2.2 EL GEN <i>MLC1</i>.</b>	<b>11</b>
<b>2.3 EXPRESIÓN DEL mRNA DE <i>MLC1</i> EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO.</b>	<b>15</b>
<b>2.4 LA PROTEÍNA <i>MLC1</i>.</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1 Características generales.</b>	<b>16</b>
<b>2.4.2 Ortólogos de la proteína <i>MLC1</i>.</b>	<b>17</b>
<b>2.4.3 Estructura y función de <i>MLC1</i>.</b>	<b>20</b>
<b>2.4.4 Localización de <i>MLC1</i> en tejido y en astrocitos.</b>	<b>24</b>
<b>2.5 MUTACIONES DE <i>MLC1</i>: MECANISMO MOLECULAR DE PATOGÉNESIS.</b>	<b>28</b>
<b>2.6 CONSECUENCIAS MOLECULARES DE LA PÉRDIDA DE <i>MLC1</i>.</b>	<b>29</b>
<b>2.7 TRATAMIENTO PARA PACIENTES DE MLC.</b>	<b>31</b>
<b>3. <u>MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.</u></b>	<b>33</b>
<b>3.1 CADHERINAS.</b>	<b>33</b>
<b>3.2 NECTINAS.</b>	<b>36</b>
<b>3.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (CAM) DE LA SUPERFAMILIA DE INMUNOGLUBULINAS (Ig).</b>	<b>40</b>
<b>3.1.1 Familia L1-CAM.</b>	<b>40</b>
<b>L1.</b>	<b>41</b>
<b>CHL1.</b>	<b>45</b>
<b>NrCAM.</b>	<b>46</b>
<b>Neurofascina.</b>	<b>48</b>
<b>3.1.2 Contactinas.</b>	<b>50</b>

3.4 OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.	54
3.4.1 AMOG.	54
3.4.2 Necl-1.	55
3.4.3 Neuroliquina.	56
3.4.4 El receptor de efrina (Eph receptor) tirosina quinasa y sus ligandos efrinas (Eph).	56
3.4.5 MAG.	56
4. <u>CANALES DE CLORURO ASTROGLIALES.</u>	59
4.1 EL CANAL CLC-2	60
4.1.1 Generalidades de CIC-2.	60
4.1.2 Relación estructura-función de CIC-2.	61
4.1.3 Proteínas que interaccionan con CIC-2 y regulación.	62
4.1.4 Funciones asociadas a CIC-2 en el cerebro.	63
4.2 ACTIVIDAD VRAC. CARACTERÍSTICAS.	66
5. <u>FISIOLOGÍA ASTROCITARIA RELACIONADA CON MLC.</u>	69
5.1 REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR.	71
5.2 TAMPONACIÓN DEL POTASIO EXTRACELULAR.	78
5.3 FORMACIÓN DE REDES GLIALES.	84
 <u>OBJETIVOS</u>	 87
 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	 91
1. <u>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</u>	93
1.1 OBTENCIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DEL DNA.	93
1.1.1 Método de obtención de bacterias electrocompetentes de alta eficiencia.	94
1.1.2 Transformación de bacterias.	95
a) Método de electroporación.	95
b) Método de choque térmico ( <i>HEAT SHOCK</i> ).	97
1.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.	97
1.2.1 Minipreparaciones.	98
1.2.2 Maxipreparaciones.	100
1.2.3 Precipitación del DNA.	102
1.2.4 Cuantificación del DNA.	103
1.2.5 Secuenciación.	104
1.3 CLONAJE DE DNA PLASMÍDICO.	105

1.3.1 Clonación clásica mediante el uso de enzimas de restricción.	105
1.3.1.1 Digestión con enzimas de restricción.	105
1.3.1.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	107
1.3.1.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.	108
1.3.1.4 Tratamiento con fosfatasa alcalina.	110
1.3.1.5 Ligación y transformación.	110
1.3.2 Clonación por recombinación mediante el sistema Gateway ( <i>Invitrogen</i> ).	112
1.3.2.1 Clonaje con el sistema Gateway simple.	113
1.3.2.2 Reacción <i>attB</i> x <i>attP</i> . Construcción de <i>entry clones</i> .	115
1.3.2.3 Reacción <i>attL</i> x <i>attR</i> . Construcción de vectores de expresión.	116
1.3.2.4 Clonaje con el sistema Gateway <i>Multisite</i> de 2 fragmentos.	116
1.3.2.5 Utilización del <i>software Vector NTI</i> para la construcción virtual de clones.	118
1.3.3 Construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida.	119
1.3.3.1 Reacción de PCR.	119
1.3.3.2 Construcción de mutantes por PCR recombinante.	120
1.4 OBTENCIÓN DE RNA, RT-PCR, CONSTRUCCIÓN E INYECCIÓN DE RNA MENSAJERO TRANSCRITO “ <i>IN VITRO</i> ”.	122
1.4.1 Normas generales para la manipulación de RNA.	122
1.4.2 Obtención de RNA.	123
1.4.2.1 Obtención de RNA mediante el uso de Trizol.	124
1.4.2.2 Obtención de RNA mediante el uso del <i>kit</i> comercial <i>Nucleo Spin RNA II (Macherey-Nagel)</i> .	125
1.4.2.3 PCR en transcripción reversa (RT-PCR).	127
1.4.3 Construcción de RNA mensajero transcrito <i>in vitro</i> .	128
1.4.4 Inyección de RNA mensajero transcrito <i>in vitro</i> .	131
<b>2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE PROTEÍNAS.</b>	132
2.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.	132



2.1.1 Obtención de proteína total a partir de células y de tejido.	132
2.1.2 Obtención de proteína total a partir de pez cebra.	135
2.1.3 Determinación de la concentración proteica.	137
2.2 ENSAYO DE WESTERN BLOT.	140
2.2.1 Electroforesis <i>SDS-PAGE</i> .	140
2.2.2 Transferencia.	143
2.2.3 Inmunodetección.	145
2.3 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.	147
2.3.1 Purificación de IgGs mediante afinidad por el péptido.	148
2.4 INMUNOCITOQUÍMICA.	152
2.5 INMUNOFLUORESCENCIA <i>WHOLE-MOUNT</i> SOBRE EMBRIONES DE PEZ CEBRA.	155
2.6 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP).	160
2.6.1 Solubilización de las muestras.	160
2.6.2 Preparación de la proteína A sefarosa.	160
2.6.3 Inmunoprecipitación clásica con proteína A sefarosa.	161
2.6.4 Inmunoprecipitación con el sistema <i>Aminolink Plus Immobilization kit (pierce 44894 20394)</i> .	164
2.7 TRATAMIENTO CON ENDO-F Y ENDO-H.	167
2.8 ELISA.	169
2.9 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR LUMINISCENCIA.	171
2.10 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO ( <i>FACS</i> ).	174
<b><u>3. CULTIVOS CELULARES.</u></b>	176
3.1 LÍNEAS CELULARES.	177
3.1.1 Condiciones generales de cultivo para células HeLa y HEK 293.	177
3.1.2 Tripsinización.	178
3.1.3 Congelación de células.	179
3.1.4 Descongelación de células.	179
3.2 CULTIVOS PRIMARIOS.	180
3.2.1 Obtención de cultivo primario de astrocitos de rata.	180
3.2.2 Purificación del cultivo primario de astrocitos de rata.	184
3.3.3 Diferenciación del cultivo primario de astrocitos	

de rata.	184
3.2.4 Soluciones necesarias para realizar <i>Patch-clamp</i> en astrocitos de rata diferenciados con diBAMPc.	185
3.2.5 Aplicación de distintos tratamientos a los astrocitos primarios de rata diferenciados.	186
<b>3.3 TRANSFECCIÓN CELULAR.</b>	<b>189</b>
3.3.1 Transfección transitoria con fosfato cálcico en células HeLa y HEK 293.	190
3.3.2 Transfección transitoria con transfectina o lipofectamina 2000 en células HeLa y HEK 293.	193
3.3.3 Transfección transitoria con lipofectina en astrocitos primarios de rata.	194
3.3.4 Determinación de la eficiencia de transfección por citometría de flujo ( <i>FACS</i> ).	196
<b>3.4 PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS.</b>	<b>197</b>
3.4.1 Adenovirus.	197
3.4.2 Producción de adenovirus.	198
3.4.3 Amplificación de adenovirus.	200
3.4.4 Titulación de adenovirus.	200
<b>3.5 TRANSDUCCIÓN DE ASTROCITOS CON ADENOVIRUS.</b>	<b>203</b>
<b><u>4. MÉTODOS DE COMPLEMENTACIÓN DE FRAGMENTOS DE PROTEÍNA.</u></b>	<b>204</b>
4.1 MÉTODO DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR DE FLUORESCENCIA ( <i>BiFC</i> ).	204
4.2 MÉTODO DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR DE LUMINISCENCIA ( <i>BiLC</i> ).	207
4.2.1 Medición de la actividad $\beta$ -Galactosidasa.	210
4.3 MÉTODO DE COMPLEMENTACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>TEV</i> PROTEASA ( <i>SPLIT-TEV</i> ).	211
<b><u>5. APÉNDICE. SOLUCIONES DE USO GENERAL.</u></b>	<b>215</b>
<b><u>6. ANEXO: CONSTRUCCIONES GENERADAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.</u></b>	<b>218</b>
<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u></b>	<b>223</b>
<b><u>CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LAS VÍAS DE DEGRADACIÓN DE LA PROTEÍNA MLC1 Y DE VARIAS VARIANTES QUE PORTAN DIFERENTES MUTACIONES PRESENTES EN PACIENTES CON MLC.</u></b>	<b>225</b>

1. RETENCIÓN INTRACELULAR DE LAS VARIANTES PROTEICAS PORTADORAS DE MUTACIONES EN <i>MLC1</i> .	227
2. DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE PRESENTAN MUTACIONES EN <i>MLC1</i> .	231
3. ESTRATEGIAS QUÍMICAS PARA MEJORAR LA EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES PROTEICAS DEFECTIVAS EN <i>MLC1</i> .	232
4. DISCUSIÓN.	233
<b><u>CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL INTERACTOMA DE <i>MLC1</i></u></b>	<b>237</b>
1. INTRODUCCIÓN.	239
2. IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS.	240
2.1 Candidatos obtenidos mediante el sistema <i>split-ubiquitin DUALmembrane</i> .	240
2.3 Candidatos obtenidos mediante técnicas proteómicas.	242
3. PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍA PARA VALIDAR INTERACCIONES ENTRE <i>MLC1</i> Y POSIBLES CANDIDATOS.	246
3.1 Introducción.	246
3.2 Métodos de complementación de fragmentos de proteína.	248
3.2.1 <i>BiFC</i> .	248
3.2.2 <i>BiLC</i> .	251
4. PROTEÍNAS CANDIDATAS.	255
5. <i>GLIALCAM</i> .	264
5.1 Introducción.	264
5.2 Estudios bioquímicos para demostrar la interacción entre <i>MLC1</i> y <i>GlialCAM</i> .	268
5.3 Estudio de las mutaciones de <i>GLIALCAM</i> encontradas en pacientes de MLC en células HeLa.	277
5.4 Análisis de dos formas de <i>GlialCAM</i> delecionadas para intentar encontrar dominios de interacción entre moléculas de <i>GlialCAM</i> o con <i>MLC1</i> .	285
5.5 Estudios de las mutaciones de <i>GLIALCAM</i> encontradas en pacientes de MLC en cultivos primarios de astrocitos.	289
5.6 Otros estudios de <i>GlialCAM</i> en cultivos primarios de astrocitos.	295

<b>6. GLIALCAM Y CLC-2.</b>	<b>301</b>
6.1 Introducción.	301
6.2 Estudios bioquímicos que demuestran la interacción entre GlialCAM y CLC2.	304
6.3 Estudio de las mutaciones de <i>GLIALCAM</i> encontradas en pacientes de MLC en células HeLa.	312
6.4 Análisis de dos formas de GlialCAM delecionadas para intentar encontrar dominios de interacción entre moléculas de GlialCAM y CLC-2.	315
6.5 Estudios de las mutaciones de <i>GLIALCAM</i> encontradas en pacientes de MLC en cultivos primarios de astrocitos.	318
6.6 Relación fisiológica entre GlialCAM y CLC-2.	321
6.7 Discusión.	332
<b><u>CAPÍTULO 3: ESTUDIOS INICIALES PARA LA OBTENCIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD MLC EN EL PEZ CEBRA</u></b>	<b>345</b>
1. CLONAJE DE LA PROTEÍNA ORTÓLOGA DE MLC1 EN EL PEZ CEBRA.	347
2. PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA ZMLC1.	348
3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE ZMLC1 EN EL PEZ CEBRA.	348
4. CREACIÓN DE UN MODELO DE ENFERMEDAD DE MLC EN EL PEZ CEBRA.	352
5. GLIALCAM EN EL PEZ CEBRA.	354
6. DISCUSIÓN.	362
<b><u>DISCUSIÓN FINAL.</u></b>	<b>365</b>
<b><u>CONCLUSIONES.</u></b>	<b>371</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	<b>375</b>
<b><u>ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS.</u></b>	<b>399</b>



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1: Imágenes de MRI correspondientes a un paciente de MLC y a un control. **(página 10)**

Figura 2: Microfotografías que muestran la presencia de vacuolas en la sustancia blanca de un paciente de MLC. **(página 11)**

Figura 3: Estructura genómica del gen *MLC1*. **(página 12)**

Tabla 1. Mutaciones identificadas en el gen *MLC1* en pacientes con MLC. **(página 13)**

Figura 4: Representación esquemática de la proteína MLC1 humana, según las predicciones informáticas. **(página 17)**

Figura 5: Alineamiento de la secuencia de la proteína MLC1 en 13 especies diferentes. **(página 20)**

Figura 6: Localización de MLC1 en astrocitos y en fibras nerviosas. **(página 24)**

Figura 7: Localización de MLC1 a nivel de microscopía electrónica. **(página 25)**

Figura 8: Modelo celular astrocitario de MLC desarrollado por nuestro laboratorio (Duarri et al., 2011). **(página 27)**

Figura 9: Las variantes mutantes S280L y C326R de MLC1 presentan una afectación en la llegada a la membrana plasmática en comparación con la proteína salvaje. **(página 28)**

Figura 10: Imagen de microscopía electrónica del cerebro de un paciente de MLC. **(página 30)**

Figura 11: Composición molecular de la sinapsis. **(página 39)**

Figura 12: Representación esquemáticas de la molécula de adhesión L1. **(página 42)**

Figura 13: Modelo de ensamblaje de NF-186 y NrCAM con Gln en los nodos de Ranvier en los axones periféricos. **(página 50)**

Figura 14: Esquema resumen donde se muestra la localización de canales iónicos y moléculas de adhesión de la superfamilia Ig-CAM en los distintos subdominios del nódulo de Ranvier en el SNC. **(página 54)**

Figura 15: Moléculas de adhesión presentes en los astrocitos que participan en la sinapsis. **(página 55)**

Figura 16: Típica sinapsis inhibitoria PV-BC (*parvalumin-expressing basket cells*). **(página 65)**

Figura 17: Características de la corriente mediada por VRAC. **(página 67)**

Figura 18: Polarización de los astrocitos en dos dominios funcionales. **(página 69)**

Figura 19: Nomenclatura de uniones *gap*. **(página 70)**

Figura 20: Hinchamiento astrogial y posibles rutas para promover la recuperación del volumen durante el RVD. **(página 77)**

Figura 21: Respuesta homeostática para mantener el volumen celular. **(página 78)**

Figura 22: Implicación de los astrocitos en la regulación del tamponamiento extracelular de K<sup>+</sup> durante la actividad sináptica y en la regulación del volumen celular. **(páginas 83-84)**

Figura 23: Dibujo esquemático donde se representa la conectividad entre astrocitos (A) y oligodendrocitos (O) a través de las uniones *gap*. **(página 86)**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Figura 24: Flexibilidad del sistema de recombinación *Gateway*. **(página 113)**

Figura 25: Esquema gráfico del método de mutagénesis por PCR recombinante. **(página 122)**

Figura 26: Purificación del anticuerpo contra la región N-terminal de la proteína MLC1 de pez cebra, utilizando el método de afinidad por el péptido. **(página 151)**

Tabla 2. Adenovirus generados. **(página 203)**

Figura 27: Esquema representativo del método *BiFC*. **(página 205)**

Figura 28: Esquema representativo del método *BiLC*. **(página 207)**

Figura 29: Esquema representativo del método *split-Tev*. **(página 212)**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **CAPÍTULO 1**

Figura 30: Modelo esquemático 2D de la proteína reportera MLC1GLYC **(página 228)**

Figura 31: MLC1GLYC está glicosilada. **(página 229)**

Figura 32: Expresión de MLC1 y MLC1GLYC en la superficie de la membrana plasmática (MP). **(página 229)**

Figura 33: Retención en el RE de las proteínas que contienen mutaciones en *MLC1*. **(página 231)**

Figura 34: Degradación lisosomal de las variantes mutantes de *MLC1*. **(página 232)**

Figura 35: Estrategias químicas para mejorar la expresión de los mutantes de *MLC1*. **(página 233)**

### **CAPÍTULO 2**

Tabla 3: Descripción de los resultados obtenidos tras la purificación por afinidad de MLC1 (los valores indican abundancia). **(página 244)**

Tabla 4: Abundancia específica encontrada tras las purificaciones con 3 anticuerpos diferentes contra MLC1. **(página 246)**

Figura 37: Diferentes fusiones de proteínas fluorescentes a MLC1. **(página 249)**

Figura 38: Detección de la homodimerización de MLC1 mediante la técnica de *BiFC*. **(página 250)**



Figura 39: Homodimerización del receptor de adenosina 2A mediante *BiFC*.  
**(página 250)**

Figura 40: Dimerización del receptor D<sub>2</sub> de dopamina y hetero-interacción entre los receptores D<sub>2</sub>R y A<sub>2</sub>AR por *BiFC*. **(página 251)**

Figura 41: Dimerización de zipper por *BiLC*. **(página 252)**

Figura 42: Dimerización de MLC1 y A<sub>2</sub>AR por *BiLC*. **(página 253)**

Figura 43: Dimerización del receptor D<sub>2</sub> de dopamina por *BiLC*. **(página 254)**

Figura 44: Interacción entre A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R por *BiLC*. **(página 255)**

Figura 45: Expresión y localización de MLC1 con los epítomos HA y Flag fusionados tanto en N- como en C-terminal. **(página 258)**

Figura 46: Expresión y localización de GlialCAM, CD9 y Claudina-1 con los epítomos HA y Flag fusionados. **(página 259)**

Figura 47: Expresión y localización de ZO-1 y CIC-2 con los epítomos HA y Flag fusionados. **(página 260)**

Figura 48: Localización de Claudina, ZO1, CD9, GlialCAM y CIC-2 en astrocitos primarios de rata. **(página 262)**

Figura 49: Evaluación de las diferentes purificaciones por afinidad con los anticuerpos indicados contra MLC1 (realizado por la empresa *Logopharm*).  
**(página 263)**

Figura 50: Ilustración esquemática de la estructura secundaria de la proteína GlialCAM. **(página 265)**

Figura 51: Interacción directa entre MLC1 y GlialCAM. **(página 269)**

Figura 52: GlialCAM no modifica los niveles en superficie de MLC1 en células HeLa **(página 270)**

Figura 53: La sobreexpresión de GlialCAM no afecta a los niveles de expresión de MLC1 en células HeLa. **(página 270)**

Figura 54: Interacción directa entre MLC1 y GlialCAM por inmunofluorescencia.  
**(página 272)**

Figura 55: Dimerización de GlialCAM por *BiLC*. **(página 274)**

Figura 56: Interacción entre MLC1 y GlialCAM por *BiLC*. **(página 274)**

Figura 57: Dimerización de MLC1 y GlialCAM por *split-TEV*. **(página 275)**

Figura 58: Interacción positiva entre MLC1 y GlialCAM por *split-TEV*. **(página 276)**

Figura 59: Representación esquemática de los dominios de GlialCAM y posición de las mutaciones puntuales encontradas en los pacientes de MLC sin mutaciones en MLC1. **(página 277)**

Tabla 5: Mutaciones en GLIALCAM elegidas para ser estudiadas bioquímicamente. **(página 278)**

Figura 60: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones recesivas o dominantes en *GLIALCAM* en células HeLa. **(página 278)**

Figura 61: Nivel de expresión de las proteínas que portan las mutaciones recesivas severas L23H y W263X. **(página 279)**

Figura 62: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC afectan a la homo-oligomerización de GlialCAM. **(página 280)**

Figura 63: Defecto en el tráfico celular de las proteínas defectivas de GlialCAM en células HeLa. **(página 281)**

Figura 64: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC casi no afectan a la hetero-interacción con MLC1. **(página 282)**

Figura 65: MLC1 sigue la localización de las variantes de GlialCAM en células HeLa. **(páginas 283-284)**

Figura 66: La variante W263X presenta un tráfico intracelular alterado severo, puesto que no es capaz de alcanzar ni la membrana plasmática ni las uniones célula-célula. **(página 285)**

Figura 67: Efecto del dominio citoplasmático y extracelular de GlialCAM en la homo-oligomerización consigo mismo y en la interacción con MLC1. **(página 286)**

Figura 68: Defecto en el tráfico celular de las 2 proteínas quiméricas de GlialCAM defectivas de la cola citoplasmática o el dominio extracelular. **(página 287)**

Figura 69: MLC1 no se concentra en las uniones celulares cuando es co-transfectado con las variantes delecionadas de GlialCAM. **(página 288)**

Figura 70: Localización subcelular de MLC1 y GlialCAM en cultivo primario de astrocitos. **(página 290)**

Figura 71: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones recesivas o dominantes en *GLIALCAM* en astrocitos primarios. **(página 290)**

Figura 72: Cambios en la localización subcelular de las variantes mutantes de *GLIALCAM* en cultivo primario de astrocitos. **(página 291)**

Figura 73: MLC1 ve alterado su tráfico cuando es co-infectado con las variantes mutantes de *GLIALCAM* en cultivo primario de astrocitos. **(páginas 292-293)**

Figura 74: Comportamiento en la localización de MLC1 tras co-infectar con niveles iguales de GlialCAM salvaje y variantes de GlialCAM mutantes. **(página 294)**

Figura 75: Comportamiento en la localización de MLC1 tras co-infectar con niveles iguales de GlialCAM salvaje y variantes de GlialCAM mutantes. **(página 295)**

Figura 76: Localización de GlialCAM en astrocitos primarios carentes de MLC1 gracias a la metodología del RNA de interferencia. **(página 296)**

Figura 77: GlialCAM ayuda a la variante mutante S246R de MLC1 llegar a los procesos astrocitarios. **(página 297)**

Figura 78: Nivel de expresión de la variante mutante de *MLC1* P92S en cultivo primario de astrocitos. **(página 298)**

Figura 79: Localización de la variante P92S en astrocitos primarios de rata. **(página 298)**

Figura 80: Nivel de expresión de la variante mutante de *MLC1* P92S en presencia de GlialCAM en cultivo primario de astrocitos. **(página 299)**

Figura 81: GlialCAM ayuda a la variante mutante P92S de *MLC1* a llegar a los procesos astrocitarios. **(páginas 299-300)**

Figura 82: GlialCAM ayuda a la variante mutante P92S de *MLC1* a aumentar sus niveles en la membrana plasmática. **(pagina 300)**

Figura 83: Análisis de la estabilidad proteica de la variante mutante de *MLC1* P92S con o sin GlialCAM en cultivo primario de astrocitos. **(página 301)**

Figura 84: Identificación de CIC-2 como una proteína asociada al interactoma de GliaCAM. **(página 302)**

Figura 85: Co-inmunoprecipitación de GlialCAM usando un anticuerpo contra CIC-2. **(página 304)**

Figura 86: Interacción directa entre GlialCAM y CIC-2. **(página 305)**

Figura 87: Interacción positiva entre CIC-2 y GlialCAM por *split-TEV*. **(página 305)**

Figura 88: GlialCAM no modifica los niveles en superficie de CIC-2 ni en células HeLa ni en astrocitos primarios. **(página 306)**

Figura 89: GlialCAM cambia la distribución subcelular de CIC-2 en células HeLa. **(página 307)**

Figura 90: Efecto de GlialCAM sobre la interacción entre *MLC1* y CIC-2 por *split-TEV*. **(página 309)**

Figura 91: Efecto de GlialCAM sobre la interacción entre CIC-2 y *MLC1* por *split-TEV*. **(página 309)**

Figura 92: CIC-2 es capaz de interactuar con CIC-1 y GlialCAM también lo hace con CIC-1. **(página 311)**

Figura 93: GlialCAM es capaz de llevar a CIC-1 a las uniones célula-célula. **(página 312)**

Figura 94: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC no afectan a la hetero-interacción con CIC-2. **(página 313)**

Figura 95: Las variantes proteicas portadoras de dos mutaciones en *GLIALCAM* interactúan bioquímicamente con CIC-2. **(página 313)**

Figura 96: CIC-2 sigue la localización de las variantes de GlialCAM en células HeLa. **(página 314)**

Figura 97: Cuantificación del efecto de las variantes de GlialCAM sobre la localización de CIC-2. **(página 315)**

Figura 98: Efecto del dominio citoplasmático y extracelular de GlialCAM en la interacción con CIC-2. **(página 316)**

Figura 99: CIC-2 no se concentra en las uniones celulares cuando es co-trasfectado con las variante de GlialCAM que tiene delecionado el dominio extracelular. **(página 317)**

Figura 100: GlialCAM cambia la distribución subcelular de CIC-2 también en astrocitos primarios. **(página 318)**

Figura 101: CIC-2 ve alterado su tráfico cuando es co-infectado con las variantes mutantes de *GLIALCAM* en cultivo primario de astrocitos. **(páginas 319-320)**

Figura 102: El tratamiento de los astrocitos de rata con diBAMPc no afecta a la expresión de CIC-2 ni de GlialCAM. **(página 322)**

Figura 103: GlialCAM modifica las corrientes mediadas por CIC-2 en astrocitos primarios de rata. **(página 323)**

Figura 104: La sobreexpresión de GlialCAM en astrocitos primarios de rata no modifica los niveles de expresión de la conexina 43 (cx43), la conexina mayoritaria astrocitaria. **(página 324)**

Figura 105: La sobreexpresión de GlialCAM en astrocitos de rata no modifica la localización de la Cx43. **(página 324)**

Figura 106: Las corrientes de Cl<sup>-</sup> mediadas por CIC-2/GlialCAM no se ven afectadas tras el tratamiento con un inhibidor de las uniones tipo *gap glycyrrhetic acid* (GA). **(página 325)**

Figura 107: El tratamiento de astrocitos primarios de rata con medio hiposmótico o con alto contenido en potasio no altera los niveles de expresión de CIC-2, GlialCAM o MLC1. **(página 326)**

Figura 108: El tratamiento de astrocitos primarios de rata con un medio con alto contenido en potasio parece aumentar los niveles de GlialCAM en la membrana plasmática. **(página 327)**

Figura 109: GlialCAM presenta una señal fluorescente más intensa en la membrana plasmática cuando los astrocitos son tratados con medio rico en potasio. **(página 328)**

Figura 110: El tratamiento de los astrocitos con medio fisiológico después de aplicarles un tratamiento con un medio rico en potasio parece revertir la concentración de GlialCAM en la membrana plasmática. **(página 330)**

Figura 111: Eliminar el calcio de las soluciones fisiológica y despolarizante (rica en potasio) no nos dio información relevante, ya que los astrocitos no presentaban una morfología normal y GlialCAM aparecía en agregados alrededor del núcleo, incluso en la solución fisiológica. **(página 331)**

Figura 112: El mayor efecto de la asociación de GlialCAM en la membrana plasmática ocurre a una concentración de KCl de 60 mM. **(página 332)**

Figura 113: El tratamiento de astrocitos con un medio rico en potasio parece aumentar los niveles de GlialCAM en la membrana a los 30 minutos. **(página 332)**

### **CAPÍTULO 3**

Figura 114: Expresión y localización de zMLC1 en células HeLa transfectadas. **(página 348)**

Figura 115: La expresión de zMLC1 en el pez cebra adulto es similar a lo que ocurre en humanos. **(página 349)**

Figura 116: Marcaje del anticuerpo anti-zMLC1 en embriones de pez cebra de día 5. **(página 350)**

Figura 117: zMLC1 se expresa alrededor de vasos sanguíneos como la proteína MLC1 humana en el cerebro del pez cebra. **(página 351)**

Figura 118: zMLC1 puede expresarse en la capa de células ganglionares del ojo de manera similar a como lo hace en ratón. **(página 352)**

Figura 119: El pez mutante con la mutación de MLC1 I80R en homocigosis resulta en una pérdida total de la proteína zMLC1. **(página 354)**

Figura 120: Localización de zHepaCAM A y zHepaCAM B en células HeLa. **(página 355)**

Figura 121: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones dominantes en zHepaCAM en células HeLa. **(página 356)**

Figura 122: Localización de las variantes dominantes de zHepaCAM en células HeLa. **(página 357)**

Figura 123: zMLC1 sigue a zHepaCAM a las uniones célula-célula. **(página 358)**

Figura 124: zMLC1 sigue la localización de las variantes de zHepaCAM en células HeLa. **(página 359)**

Figura 125: Localización de zHepaCAM-GFP en células HeLa. **(página 360)**

Figura 126: Comportamiento de zCIC-2 en presencia de zHepaCAM en células HeLa. **(página 361)**

# INTRODUCCIÓN

*El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.  
Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos.*

*Albert Einstein*





En la introducción primeramente se clasificarán las leucodistrofias y se ahondará en los aspectos clínicos y moleculares de MLC, nuestra enfermedad de estudio. Posteriormente se tratarán dos capítulos basados en los hallazgos encontrados durante esta Tesis, que han sido el encontrar una molécula de adhesión implicada en la patogénesis de MLC y un canal de cloruro asociado a dicha molécula. Es por ello que se ha querido desarrollar un capítulo donde se expondrán las funciones de algunas de las moléculas de adhesión más importantes del sistema nervioso central. Esto podrá aportarnos ideas acerca de las funciones que nuestra molécula de adhesión puede estar llevando a cabo y por qué mutaciones en su gen dan lugar a MLC. Otro capítulo que se ha implementado es acerca del papel de los canales de cloruro en las células gliales, ya que MLC es una leucodistrofia de tipo vacuolizante, y es muy posible que estos canales puedan estar implicados en su patogénesis. Finalmente, se quiere contextualizar la función de estas moléculas conjuntamente (moléculas de adhesión y canales de cloruro) en la fisiología de los astrocitos, en las funciones astrocitarias que nosotros creemos que pueden estar afectadas en MLC.

## **1. ENFERMEDADES GENÉTICAS ASOCIADAS A DEFECTOS EN LA MIELINA: LAS LEUCODISTROFIAS.**

La mielina presenta un importante papel en la rápida transmisión del impulso nervioso. Existe un amplio conjunto de enfermedades provocadas por un defecto en la generación de la mielina o bien un defecto en el desarrollo de la misma. Entre estas enfermedades destacan las leucodistrofias.

La palabra *leucodistrofia* proviene de las raíces griegas “*leuco*” (blanco), “*dis*” (discapacidad), “*trophos*” (crecimiento); por tanto, las leucodistrofias agrupan un conjunto de trastornos genéticos del sistema nervioso donde la generación, el desarrollo y/o el mantenimiento de la mielina se ven afectados. El término “leucodistrofia” se restringe a aquellas enfermedades de origen genético excluyendo trastornos de tipo inflamatorio o autoinmune (como sería el caso de la esclerosis múltiple) o de origen ambiental, como los causados por la exposición a disolventes orgánicos. Las leucodistrofias que implican al SNC, se denominan leucoencefalopatías.

Existen numerosos genes implicados en el correcto mantenimiento y funcionamiento de la mielina. Defectos en dichos genes pueden ser heredados de forma dominante, recesiva o ligada al cromosoma X; incluso existen leucodistrofias donde la mutación aparece de forma espontánea, no existiendo transmisión hereditaria. Pero también existen patologías que afectan a la sustancia blanca de un modo indirecto. Estas enfermedades están provocadas por mutaciones en genes o trastornos metabólicos no relacionados directamente con la mielina, pero que provocan defectos en la misma.

## 1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCODISTROFIAS.

● Siguiendo un criterio patológico podemos distinguir 3 tipos de leucoencefalopatías:

- Desmielinizantes, en las que ocurre una degradación en la mielina, y un defecto en su estructura, debido generalmente a la acumulación de compuestos lipídicos que resultan tóxicos para los oligodendrocitos. Leucodistrofias representativas de este tipo son la Adrenoleucodistrofia, la Leucodistrofia globoide celular o Enfermedad de Krabbe y la Leucodistrofia Metacromática.

- Hipomielinizantes, donde el defecto se produce debido a una baja producción de mielina, debido normalmente a una disfunción proteica que provoca una deficiente compactación de ésta. Aquí destacan la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, la enfermedad de Alexander, la leucoencefalopatía llamada *Vanishing white matter* (VWM) y la deficiencia en MBP, entre otras.

- Espongiformes, caracterizadas por una degeneración quística de la mielina, ya que están afectadas principalmente las vías implicadas en el control del volumen celular. Dos ejemplos típicos de este tipo de leucodistrofias son la enfermedad de Canavan y la Leucoencefalopatía Megalencefálica con quistes subcorticales (MLC).

● Siguiendo un criterio bioquímico, se pueden agrupar las leucoencefalopatías en función de los diferentes genes alterados. Así, tenemos:

- *Trastornos lipídicos*: Adrenoleucodistrofia, Enfermedad de Krabe, Leucodistrofia Metacromática, Síndrome Sjögren-Larsson o Xantomatosis cerebrotendinosa.

- *Trastornos de las proteínas de la mielina*: Pelizaeus-Merzbacher, deficiencia en MBP...
- *Trastornos relacionados con ácidos orgánicos*: Enfermedad de Canavan.
- *Trastornos en el metabolismo energético*: MELAS, Leber, Complejo I y III, Citocromo oxidasa.
- *Otras causas*: CADASIL, deficiencia en la merosina...
- *Causas desconocidas*: Enfermedad de Alexander, *Vanishing white matter*, MLC...

La mielinización se produce durante los primeros dos años de vida pero el proceso no se termina totalmente hasta la adolescencia. Por este motivo, las leucodistrofias aparecen mayoritariamente en la infancia.

La formación de la mielina y su mantenimiento requiere el funcionamiento conjunto de los oligodendrocitos, los astrocitos y las neuronas. Los astrocitos se han relacionados con el mantenimiento de la sustancia blanca (Liedtke et al., 1996), y juegan un papel muy importante en algunas leucodistrofias, como son la leucoencefalopatía VWM, la enfermedad de Alexander (Sen and Levison, 2006) y la MLC.

## **2. LEUCOENCEFALOPATÍA MEGALENCEFÁLICA CON QUISTES SUBCORTICALES (MLC).**

Durante la presente Tesis se ha tratado de avanzar en el mecanismo patofisiológico de la *Leucoencefalopatía Megalencefálica con Quistes Subcorticales (MLC)*.

En el año 1991, un neurólogo de Bombay, presentó las características clínicas de un determinado número de pacientes locales, pertenecientes a un grupo determinado del norte de la India, conocido como los Agarwals. Dichos pacientes mostraban signos de megalencefalia, un ligero retraso mental y espasticidad progresiva. No se encontraron anomalías a nivel metabólico. Estudios de neuroimagen mostraban claros signos correspondientes a un trastorno de la sustancia blanca, con la característica presencia de quistes mayoritariamente a nivel subcortical. Debido al tipo de transmisión genética se propuso que dicha enfermedad presentaba una herencia autosómica recesiva.

Desde su descubrimiento, la enfermedad ha adoptado diferentes nomenclaturas, si bien la mayor parte de los investigadores implicados en el campo han consensuado la denominación de “MLC”, como acrónimo para la “*Leucoencefalopatía Megalencefálica con Quistes Subcorticales*”.

### **2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.**

A partir del año 1995, diferentes investigadores (van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b), (Singhal et al., 1996), (Topcu et al., 1998) han propuesto un cuadro característico correspondiente a MLC, basado en aspectos clínicos y en análisis de neuroimagen (MRI). Por tanto, la identificación de la enfermedad se basa en los siguientes puntos:

1. Macrocefalia a partir del primer año de vida. Tras el primer año de edad, el crecimiento de la cabeza resulta generalmente normal, llegando a alcanzar una línea paralela al percentil 98.
2. Desarrollo inicial de los pacientes sin alteraciones, tanto a nivel cognitivo como motor. Durante los primeros estadios del desarrollo, los pacientes muestran independencia para caminar.
3. Deterioro de las funciones motoras y ataxia cerebelar junto con espasticidad durante la niñez tardía o la adolescencia. La capacidad para caminar es limitada e inestable, produciéndose caídas frecuentes. La mayoría de los pacientes necesitan silla de ruedas a partir de la adolescencia. El tono muscular tiende a ser escaso y los reflejos de los tendones extensores demasiado bruscos.
4. Dificultades de tipo disártrico en el lenguaje, pudiendo desarrollar disfagia.
5. Anormalidades a nivel del movimiento extrapiramidal, incluyendo distonia y atenosis, en períodos más tardíos.
6. Ligero retraso mental tardío, menos severo que el deterioro motor.
7. Episodios epilépticos presentes en la mayoría de los pacientes, los cuales se podrían controlar con relativa facilidad (Yalcinkaya et al., 2003).
8. Deterioro eventual debido a la manifestación de un trauma craneoencefálico, provocando episodios epilépticos, períodos de inconsciencia prolongada que pueden desencadenar en estado de coma (Bugiani et al., 2003) o deterioro motor agudo que aumenta gradualmente.

A pesar de que MLC presenta un patrón fenotípico característico, existe una gran variabilidad en cuanto a las manifestaciones clínicas entre los diferentes pacientes, incluso entre miembros de la misma familia (Blattner et

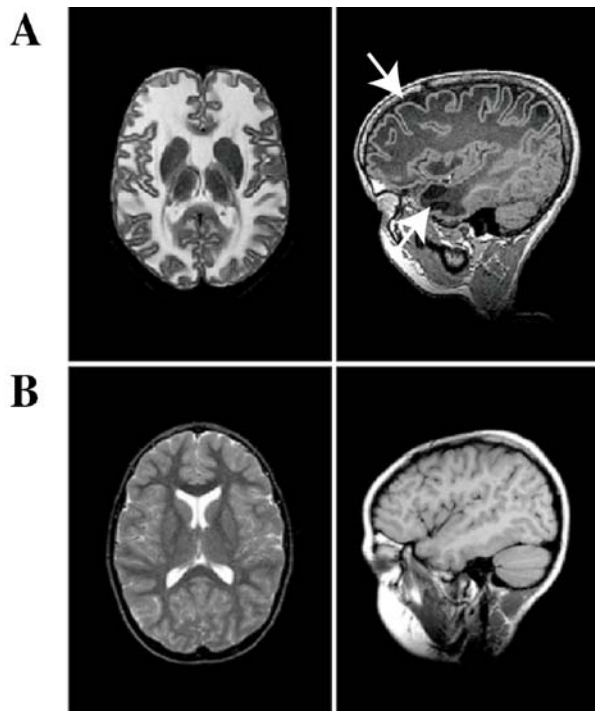
al., 2003). Así, algunos pacientes pierden la capacidad de caminar a edades muy tempranas, mientras que otros la conservan hasta una edad mayor. Algunos presentan un retraso mental agudo mientras que otros consiguen terminar estudios superiores. En cuanto a la esperanza de vida, existen pacientes que perecen durante la adolescencia, y otros pueden alcanzar los 40 años de edad. Dicha heterogeneidad clínica indica que existen factores ambientales o genéticos que influyen en la severidad de la enfermedad (Blattner et al., 2003).

Estudios basados en neuroimagen, mediante técnicas de MRI, muestran un patrón característico para MLC que la diferencia de otras leucodistrofias (van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b); (Singhal et al., 1996), (Topcu et al., 1998). Los criterios basados en MRI son los siguientes:

1. Encéfalo atrofiado e hinchado que muestra una sustancia blanca anormalmente difusa, (Figura 1 A), comparado con un encéfalo de un niño que no presenta la enfermedad (Figura 1 B).
2. En estructuras centrales como el cuerpo calloso, la cápsula interna, y el tronco cerebral, la sustancia blanca se encuentran mejor conservada, si bien su integridad no suele ser total.
3. La sustancia blanca correspondiente al cerebelo suele presentar una señal ligeramente anormal, aunque su volumen no es mayor de lo normal.
4. Presencia de quistes subcorticales a nivel anterior-temporal y fronto-parietal (Figura 1 A, flechas), característicos de la enfermedad.
5. A lo largo del desarrollo de la enfermedad, el volumen desmesurado de la sustancia blanca disminuye, mientras que la atrofia cerebral continúa. Además, el tamaño y el número de quistes suele aumentar en el tiempo. En algunos



pacientes, el tamaño de éstos aumenta hasta ocupar una gran parte de la sustancia blanca fronto-parietal.

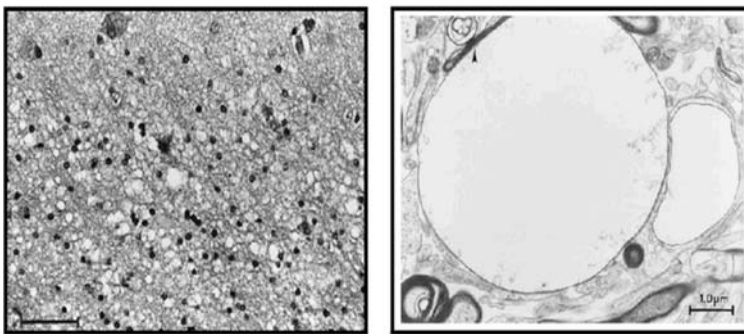


**Figura 1. Imágenes de MRI correspondientes a un paciente de MLC y a un control. (A)** MRI correspondiente a un paciente de MLC, en el que se observa una sustancia blanca anormalmente difusa y la presencia de quistes a nivel fronto-parietal y anterior-temporal (flechas). **(B)** MRI correspondiente a un niño no afectado por la enfermedad. (Izquierda, vistas axiales; derecha, vistas sagitales).

Mediante análisis utilizando técnicas de espectroscopia por resonancia magnética de protones se ha observado una disminución en la concentración de la mayoría de los metabolitos en los pacientes de MLC. Esto sugiere que hay un aumento en el contenido de agua en el cerebro (Brockmann et al., 2003), (Sener, 2003a; Sener, 2003b).

Desde el punto de vista fisiopatológico, a partir de una biopsia obtenida de un paciente de MLC (van der Knaap et al., 1996), se observa un fenotipo de degeneración esponjiforme de la sustancia blanca. La biopsia muestra la presencia de numerosas vacuolas situadas en las láminas más externas de las vainas de mielina. Sin embargo a nivel de las capas más interiores no se observa la presencia de ninguna de estas vacuolas (Figura 2). La mayoría de ellas se encuentran cubiertas por una única membrana de mielina, aunque algunas de ellas, muy pocas, se encuentran rodeadas por estructuras

multilaminares de mielina o por prolongaciones celulares correspondientes a oligodendrocitos. Los análisis de MRI o las características histopatológicas de la enfermedad podrían sugerir que el fenotipo de los pacientes fuera más severo desde los primeros años de edad. Sin embargo, el hecho de que las vacuolas se formen solamente en las capas más externas de la mielina, tal vez no comprometa demasiado la transmisión del impulso nervioso, lo que podría explicar que el fenotipo clínico de la enfermedad sea progresivo y no mortal durante los primeros años de edad.



**Figura 2. Microfotografías que muestran la presencia de vacuolas en la sustancia blanca de un paciente de MLC. A la derecha se observa un detalle de una gran vacuola en las láminas más externas de la mielina.**

Un estudio utilizando SPECT *in vivo* (*single photon emission computed tomography*) de un paciente de MLC reveló anomalías en la corteza frontal que no se observaban mediante MRI, indicando evidencias de una disfunción neuronal cortical (Kiriya et al., 2007).

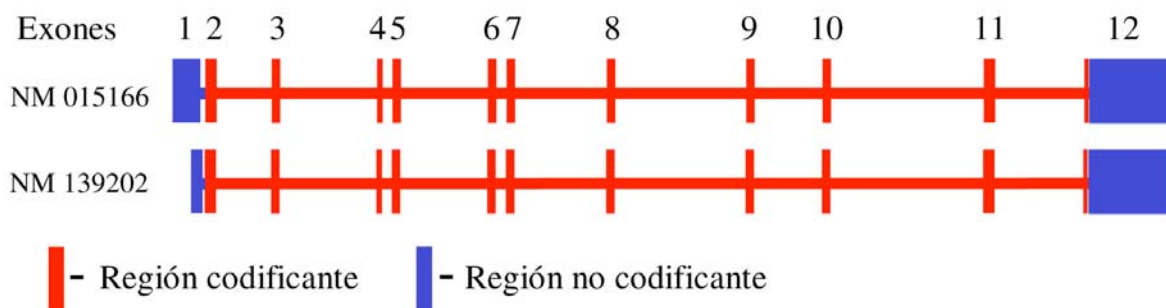
## **2.2 EL GEN *MLC1*.**

Tras estudios de ligamiento a partir de familias correspondientes a una población turca, se encontró un locus para MLC en el cromosoma 22qtel (Topcu et al., 2000).

En un estudio posterior, la región crítica implicada en la enfermedad se redujo gracias a marcadores microsatélite y recombinantes. Los genes candidatos localizados en la región crítica fueron secuenciados en los

pacientes analizados, observándose mutaciones en un gen denominado *KIAA0027* [MIM 604004]. En dicho estudio, se propuso renombrar el gen como *MLC1*, ya que se trataba del primer gen implicado en MLC (Leegwater et al., 2001).

El gen *MLC1* abarca una región en el cromosoma 22qtel de aproximadamente 26 kb y contiene 12 exones que, salvo el primero de ellos, son codificantes. Se han descrito dos transcritos alternativos que difieren a nivel de la región 5' correspondiente al primer exón pero que resultan en el mismo mRNA (de 3435 pb) y que codifican para la proteína *MLC1* (Figura 3).



**Figura 3. Estructura genómica del gen *MLC1*.** Ambas variantes (NM 015166 y NM 139202) se transcriben en un mismo mRNA de 3435 pb.

Hay descritas hasta el momento un total de 66 mutaciones diferentes en el gen *MLC1* (Tabla 1). Las mutaciones puntuales representan un 50 %; las deleciones o inserciones con cambios en la pauta de lectura corresponden a un 27 %; las mutaciones de *splicing*, un 18 %, y las *nonsense*, un 4,5 %. Estas mutaciones se han encontrado tanto en homocigosis como en heterocigosis, pero solo se ven afectados aquellos individuos que presentan una mutación en homocigosis; o bien dos mutaciones diferentes, una en cada alelo, siendo heterocigotos compuestos. El resto, son portadores asintomáticos.

Exón	Mutación en DNA	Mutación en proteína	Referencia
2	c.65G-A	p.R22Q	Wang et al, 2011
2	c.109_110delC	p.L37fsX	Montagna et al, 2006
2	c.110_111insGC	p.G38RfsX20	Boor et al, 2006
2	c.135_136insC	p.C46fsX34	Leewater et al, 2002; Ben-Zeev et al, 2002; Gorospe et al, 2004; Shinga et al, 2004;
2	c.135_136delT	p.C46fsX57	Tinsa et al, 2008
2	c.176G-A	p.G59E	Ben-Zeev et al, 2002
2	c.177_178delG	p.S60DafsX5	Patrono et al, 2003
2	c.177+1G-T	Splice defect	Patrono et al, 2003
2	c.178-10T-A	Splice defect	Boor et al, 2006
3	c.206C-T	p.S69L	Boor et al, 2006
3	c.213C-G	p.Y71X	Leewater et al, 2001
3	c.237A-G	p.M80V	Montagna et al, 2006
3	c.240G-A	p.M80I	Boor et al, 2006
3	c.249G-T	p.L83F	Leewater et al, 2002; Patrono et al, 2003;
3	c.250C-T	p.R84C	Boor et al, 2006
3	c.251G-A	p.R84H	Riel-Romero et al, 2005
3	c.255T-G	p.C85W	Leewater et al, 2002
3	c.263G-T	p.G88V	Patrono et al, 2003; Koussa et al, 2005
3	c.268-1G-A	Splice defect	Boor et al, 2006
4	c.268_422del	p.C90_1141del	Leewater et al, 2002
4	c.274C-T	p.P93S	Ben-Zeev et al, 2002; Leewater et al, 2002
4	c.278C-T	p.S93L	Montagana et al, 2006
4	c.298_423+108del	p.T99fdX	Leewater et al, 2001; Tsujino et al, 2003; Saijo et al, 2003; Montagna et al, 2006; Morita et al, 2006
4	c.322-1G-A	Splice defect	Boor et al, 2006
4	c.322-1G-A	Splice defect	DeGrauw et al, 2009
5	c.323delT	p.I108fs	Montagna et al, 2006
5	c.337-353del+G	p.I113GfsX2	Tsujino et al, 2003
5	c.353C-T	p.T118M	Leewater et al, 2002; Yüzbaşıoğlu et al, 2011
5	c.353C-G	p.T118R	Leewater et al, 2001
5	c.357_358insT	p.A120CfsX60	Patrono et al, 2003
5	c.373T-C	p.C125R	Leewater et al, 2002
5	c.387G-A	p.G130R	Montagna et al, 2006
5	c.433A-G	p.N141S	Leewater et al, 2002
5	c.423C-A	p.N141K	Leewater et al, 2002; Patrono et al, 2003
5	c.423+3_423+4insT	Splice defect	Leewater et al, 2001
5	c.423+6G-T	Splice defect	Patrono et al, 2003
5	c.423+1G-A	Splice defect	Leewater et al, 2001; Bugiani et al, 2003; Patrono et al, 2003; Riel-Romero et al, 2005
6	c.449-455del	p.L150RfsX8	Leewater et al, 2001
6	c.460_461insGGAGC	p.L154GfsX8	Leewater et al, 2001
6	c.470C-A	p.A157E	Gorospe et al, 2004
6	c.514-515delAA	p.C171fs	Montagna et al, 2006
7	c.594-597del	p.Y198X	Leewater et al, 2001, 2002
7	c.597_598delA+33	p.G206X	Boor et al, 2006
7	c.597+1G-A	Splice defect	Boor et al, 2006; deGrauw et al, 2009
8	c.603G-A	p.E202K	Montagna et al, 2006
8	c.629T-A	p.V210D	Leewater et al, 2002
8	c.634G-A	p.G212R	Leewater et al, 2001
8	c.635G-A	p.G212E	Leewater et al, 2002
8	c.714+1G-A	Splice defect	Boor et al, 2006
9	c.733G-C	p.A245P	Pascual-Castroviejo et al, 2005;
9	c.736A-C	p.S246R	Boor et al, 2006
9	c.736A-C	p.S246R	Leewater et al, 2002
10	c.805C-A	p.S269Y	Montagna et al, 2006
10	c.823C-A	p.A275N	Montagna et al, 2006
10	c.832T-C	p.Y278H	Wang et al, 2011
10	c.839C-T	p.S280L	Leewater et al, 2001
10	c.849_859delC	p.I282fsX	Patrono et al, 2003
10	c.880C-T	p.P294L	Patrono et al, 2003
10	c.895-1G-C	Splice defect	Patrono et al, 2003
10	c.895-2A-G	Splice defect	Leewater et al, 2001
10	c.832T-C	p.Y278H	Wang et al, 2011
11	c.907_930del	p.V303_L310del	Wang et al, 2011
11	c.908-918delinsGCA	p.V303GfsX95	Leewater et al, 2001; Rubie et al, 2003
11	c.910-915del	p.L304-L305del	Bugiani et al, 2003; Rubier et al, 2003
11	c.929insGCT	p.L310_311insL	Montagna et al, 2006
11	c.959C-A	p.T320K	Boor et al, 2006
11	c.976T-C	p.C326R	Leewater et al, 2002
11	c.1060-2A-G	Splice defect	Leewater et al, 2001
12	p.240706_251959de	p.Q355fsX10	Boor et al, 2006

**Tabla 1. Mutaciones identificadas en el gen *MLC1* en pacientes con MLC. (fs: cambio de pauta de lectura)**

A pesar de que se trata de una enfermedad rara y de muy baja incidencia, se observa una alta frecuencia para una determinada mutación en una población concreta. Se da mayoritariamente en el caso de aquellos grupos étnicos de alta consanguinidad (Topcu et al., 1998), sugiriendo esto un efecto fundador. Así, por ejemplo, entre la población de Agarwals de la India, prácticamente la totalidad de casos documentados presentan homocigosis para la inserción 135insC (Singhal et al., 2003), (Gorospe et al., 2004). Otro ejemplo corresponde a una mutación puntual común (G59E) entre los judíos de Libia (Ben-Zeev et al., 2002), mientras que los japoneses suelen presentar la mutación puntual S93L (Saijo et al., 2003), (Tsujino et al., 2003).

Incluso entre pacientes que portan la misma mutación en *MLC1*, existe variabilidad fenotípica intrafamiliar, indicando también que factores ambientales o genéticos pueden influenciar en la severidad de la enfermedad (Pascual-Castroviejo et al., 2005). No se ha podido encontrar por tanto, una correlación genotipo-fenotipo (Leegwater et al., 2002b), ya que la severidad del fenotipo de los pacientes no correlaciona con las mutaciones encontradas.

Algunos autores implican a cambios génicos del gen *MLC1* como desencadenante de un subtipo de esquizofrenia catatónica (Meyer et al., 2001). Su hipótesis gira en torno a que el gen *MLC1* codifica para un canal iónico no selectivo y que la mutación L309M modifica la estructura de la proteína, dando lugar a dicho subtipo de esquizofrenia. Sin embargo, numerosos grupos de investigación sugieren que dichos polimorfismos en *MLC1* no están relacionados con la esquizofrenia catatónica (Bettecken et al., 2002), (Leegwater et al., 2002a), (Ewald and Lundorf, 2002), (Devaney et al., 2002), (McQuillin et al., 2002), (Rubie et al., 2003), (Kaganovich et al., 2004). A pesar

de estos otros trabajos, a día de hoy sigue existiendo cierta controversia al respecto, ya que posteriormente, en el trabajo de (Verma et al., 2005) fueron detectados nuevos polimorfismos en el gen *MLC1* Val210Ile (V210I), Leu308Gln (L308Q) y Arg328His (R328H) implicados en esquizofrenia catatónica y en trastorno bipolar en una familia de la India. Se requiere de más trabajos de investigación para clarificar por tanto este asunto.

Las mutaciones en *MLC1* fueron encontradas en un 70% de los pacientes de MLC (Leegwater et al., 2002b), (Wang et al., 2011), (Yuzbasioglu et al., 2011). Sin embargo, existen pacientes que manifiestan las características clínicas de MLC y no presentan mutaciones en el gen *MLC1*. Dichos pacientes no muestran además ligamiento con el locus de *MLC1* (Blattner et al., 2003), (Patrono et al., 2003), lo que indica que existe otro u otros genes implicados en la enfermedad. En estos pacientes, de acuerdo con la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo, la doctora Marjo Van der Knaap (van der Knaap et al., 2010) pudo distinguir dos fenotipos entre los pacientes afectados de MLC sin mutaciones en *MLC1*. Por un lado, había pacientes que presentaban las características clínicas clásicas de MLC, y por otro lado, había pacientes con un curso clínico benigno, que comenzaban con características de MLC, pero que con el tiempo, mejoraban. Por tanto, la existencia de estos dos fenotipos era sugestivo de heterogeneidad genética.

### **2.3 EXPRESIÓN DEL mRNA *MLC1* EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO.**

El primer estudio de localización de la expresión del gen *Mlc1* en ratón adulto fue hecho por hibridación *in situ* y mostró la presencia del mRNA en

astrocitos rodeando vasos sanguíneos, en la glía de Bergmann y en células endodimales (Schmitt et al., 2003). Se detectó una elevada expresión de dicho mRNA en el cerebelo y en el bulbo olfatorio. También se observó un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo del cerebro: se comenzaba a detectar en la etapa prenatal (E14) y llegaba a su pico máximo el día post-natal 5. Esta observación se va a corroborar en un estudio realizado por nuestro grupo (Teijido et al., 2004), donde se va a encontrar una elevada expresión del mRNA en la corteza cerebelar, en la capa molecular de la glía de Bergmann. También se detectó expresión del mRNA en determinadas barreras cerebrales, concretamente en células endodimales que rodeaban el tercer ventrículo y los ventrículos laterales, en las regiones subpial y perivascular. También se observó expresión en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales de la corteza, de las neuronas granulares del hipocampo y en diferentes núcleos del cerebro medio y del tronco encefálico (Teijido et al., 2004).

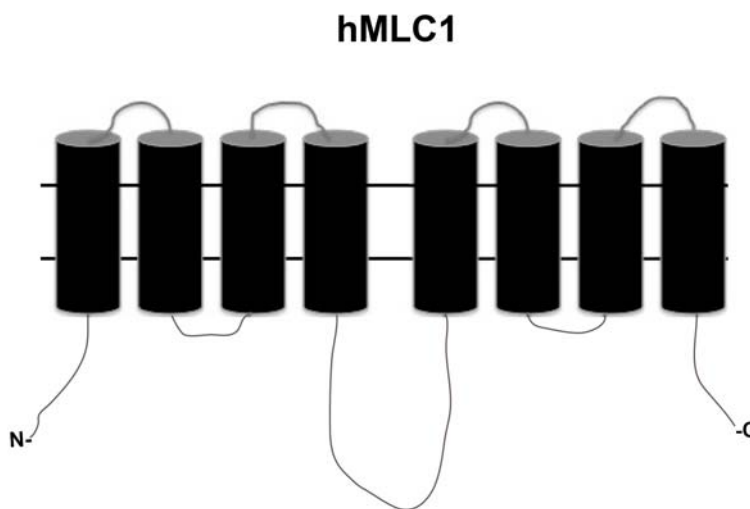
Por otro lado, en un estudio de *arrays* en glioblastomas primarios que sobreespresaban el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se encontró el gen *MLC1* sobreespresado (Mischel et al., 2003), sugiriendo que *MLC1* podría estar regulado por este factor.

## **2.4 LA PROTEÍNA MLC1.**

### **2.4.1 Características generales.**

El gen *MLC1* codifica para una proteína de membrana que lleva el mismo nombre (Leegwater et al., 2001), (Teijido et al., 2004). Está compuesta por 377 aminoácidos (en humano) y presenta un peso molecular de alrededor ~41 kDa. Según predicciones informáticas, la proteína MLC1 consta de ocho

dominios transmembrana, unidos por cuatro dominios (*loops*) extracelulares pequeños (5-8 aminoácidos), y tres intracelulares, dos de ellos cortos (7-9 aminoácidos) y uno largo, el cual divide a la proteína en dos regiones prácticamente simétricas entre sí. Además, los dos extremos amino-terminal (N-terminal) y carboxilo-terminal (C-terminal) son intracelulares (Boor et al., 2005) (Figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de la proteína MLC1 humana, según las predicciones informáticas.** En ella se muestran los ocho segmentos transmembrana, cuatro lazos extracelulares y tres intracelulares (uno de ellos más largo). Las regiones amino y carboxi-terminales son también intracelulares.

#### 2.4.2 Ortólogos de la proteína MLC1.

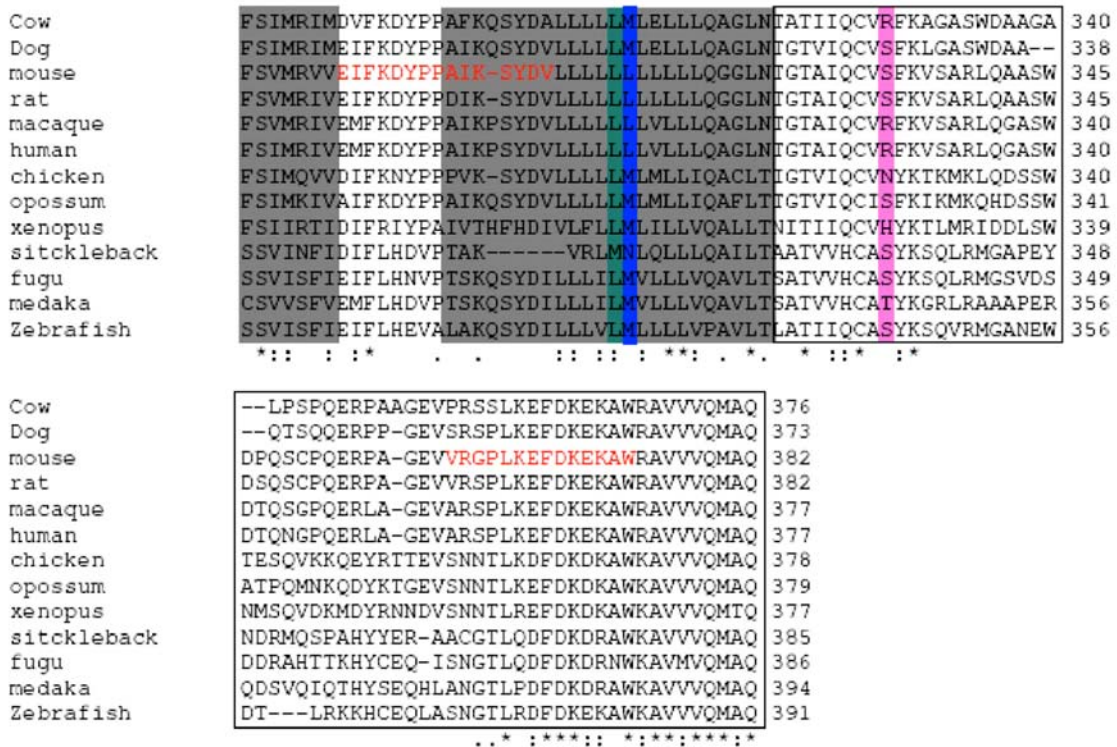
El gen *MLC1* no se encuentra presente en todos los filos animales. Así, la proteína MLC1 no se expresa en levaduras, *Caenorabditis elegans* ni *Drosophila*, sino que comienza a expresarse en cordados, en aquellos animales que contienen mielina, como es el caso del pez cebra.

Se ha realizado un alineamiento de la secuencia de varios ortólogos de la proteína MLC1 correspondientes a diferentes especies de mamíferos, aves y peces para poder realizar comparaciones estructurales. Se ha utilizado el programa *CLUSTALW Sequence Alignment (Baylor collage of Medicine)* (Figura 5). En la figura se muestran los ocho segmentos transmembrana predichos (sombreados en gris) y los dominios N- y C-terminales (en el interior



de los recuadros). El lazo intracelular que une los segmentos transmembrana IV y V se representa subrayado. Los residuos que se encuentran conservados en todas las especies se encuentran marcados con un asterisco. Como puede observarse, la región distal del C-terminal se encuentra muy conservada en la mayoría de las especies, principalmente entre ratón, rata y humano, lo que sugiere que debe tener una función importante. Sin embargo, la región N-terminal difiere mucho más entre las distintas especies, lo que nos sugiere que no es una región importante para el funcionamiento de la proteína. En rojo se muestran los aminoácidos contra los que se han dirigido los anticuerpos específicos contra la proteína MLC1 que ha desarrollado nuestro grupo.





**Figura 5. Alineamiento de la secuencia de la proteína MLC1 en 13 especies diferentes.** Los 8 segmentos transmembrana están sombreados en gris, y los residuos conservados marcados con un asterisco. Las mutaciones asociadas con la esquizofrenia catatónica se han marcado en amarillo (V210I), en verde (L308Q), azul (L309M) y en rosa (R328H). En rojo se muestran los aminoácidos contra los cuales se han dirigido los diferentes anticuerpos que se han elaborados en el grupo, tanto para la proteína humana como la de ratón.

### 2.4.3 Estructura y función de MLC1.

Debido a la dificultad de cristalizar las proteínas de membrana, la estructura de MLC1 todavía no ha podido ser abordada. En estudios de Western blot, se puede observar que la proteína, con un peso molecular de ~41 kDa, presenta una movilidad electroforética de ~37 KDa. Esto es debido a su elevada hidrofobicidad, que hace que las proteínas de membrana no incorporen SDS de manera proporcional a su masa, provocando una movilidad electroforética anómala.

Igual que ocurre con otras proteínas transportadoras de membrana, MLC1 presenta regiones de interna homología (Teijido et al., 2004). Así, los dominios transmembrana de la primera mitad de la proteína muestran

homología en secuencia con la segunda mitad. Esta homología entre las dos mitades es más evidente en los dominios transmembrana 4 y 8, los cuales se caracterizan por un conjunto de residuos de leucina. Los segmentos de poli-leucina normalmente actúan como el punto de conexión donde tiene lugar la oligomerización (Gurezka et al., 1999). Existen evidencias bioquímicas que sugieren que MLC1 forma homo-oligómeros, pues la detección de la proteína por Western blot reconoce principalmente dos bandas, las cuales probablemente corresponden a formas monoméricas y diméricas (Teijido et al., 2004), con un peso aproximado de 37 y 70 KDa. También se puede llegar a observar en ocasiones una banda a ~115 kDa, que podría corresponder a una forma trimérica. También se ha observado, a través de estudios de tráfico de proteínas que la proteína MLC1 oligomerizaba con ella misma, y que esta unión no era dependiente de puentes disulfuros (Teijido et al., 2004). Asimismo, la proteína presenta un posible lugar de glicosilación (“NPS”) entre los segmentos transmembrana 3 y 4, pero se ha comprobado que no se encuentra glicosilada (Teijido et al., 2004).

Por otro lado, estudios *in vitro* bioquímicos usando proteínas de fusión que contienen el extremo N-terminal o el C-terminal de MLC1 expresados en bacterias indican que ambos extremos son fosforilados por la proteína quinasa A/C en el residuo serina 27, y por la proteína quinasa C en el residuo serina 339 (Lanciotti et al., 2010). El tratamiento con activadores de dichas quinasas incrementa la presencia de una banda de 60 KDa, la cual se ha sugerido que representa a MLC1 asociada con la membrana plasmática, y que aumenta la presencia de la proteína MLC1 en los procesos astrocitarios (Lanciotti et al., 2010). Sin embargo, no está claro si estos residuos están involucrados en este

efecto, dado que estudios de mutagénesis eliminando la fosforilación de estas dos serinas no han sido desarrollados.

Según predicciones bio-informáticas, MLC1 tiene una baja homología con el canal *Shaker-like voltage-gated potassium channel* (Kv1.1), especialmente en el área del sensor de voltaje (Teijido et al., 2004). Así, el fenotipo vacuolizante de los pacientes y la baja similaridad que posee con canales iónicos, ha hecho que se especule con que MLC1 pudiera ser un canal iónico por sí mismo, una subunidad de un canal o un transportador relacionado con la homeostasis del agua. (Kaganovich et al., 2004), (Leegwater et al., 2001), (Teijido et al., 2004). Sin embargo, estudios de *voltage-clamp* con oocitos de *Xenopus* y en células tsA-201 no han podido confirmar esta hipótesis (Kaganovich et al., 2004), (Teijido et al., 2004).

Interesantemente, el ratón *knock-out* (KO) de *Kv1.1* presenta unas características fenotípicas en homocigosis de macrocefalia, deterioro motor progresivo y ataques parciales de epilepsia (Persson et al., 2007). Además, se ha observado también, tras el análisis del patrón de expresión de genes con *microarrays* en este KO, que existía una represión del mRNA de MLC1, la cual se veía aumentada en presencia del antiepiléptico carbamazepina (Almgren et al., 2008). Por otro lado, en otro ratón KO heterocigoto de *RFX4 v3* (factor de transcripción importante para el desarrollo del cerebro), el cual presentaba hidrocefalia congénita, había una represión de la expresión del gen de *MLC1*, probablemente debido a la falta de unión de este factor a la secuencia *X-box* del promotor de *MLC1* (Zhang et al., 2006).

Se han efectuado estudios de co-expresión de MLC1 y el canal Kv1.1 en oocitos de *Xenopus* para ver si MLC1 afectaba en alguna medida a dicho



canal, pero no se detectó ningún cambio en las propiedades funcionales del mismo (Teijido et al., 2004). Resultados similares se realizaron con el canal Kir4.1, el principal canal de potasio presente en astrocitos, pero no se encontraron cambios en las propiedades del canal tras la co-expresión de MLC1 (Teijido et al., 2007). Sin embargo, recientemente, se ha mostrado que la expresión de MLC1 induce la actividad VRAC (*volumen-regulated anion channel*) en células HEK y Sf9 (Ridder et al., 2011). Sin embargo, estos resultados no indican que MLC1 sea VRAC o que MLC1 regule directamente el canal, ya que muchas proteínas diferentes e incluso cambios en el estado celular pueden influenciar dicha actividad.

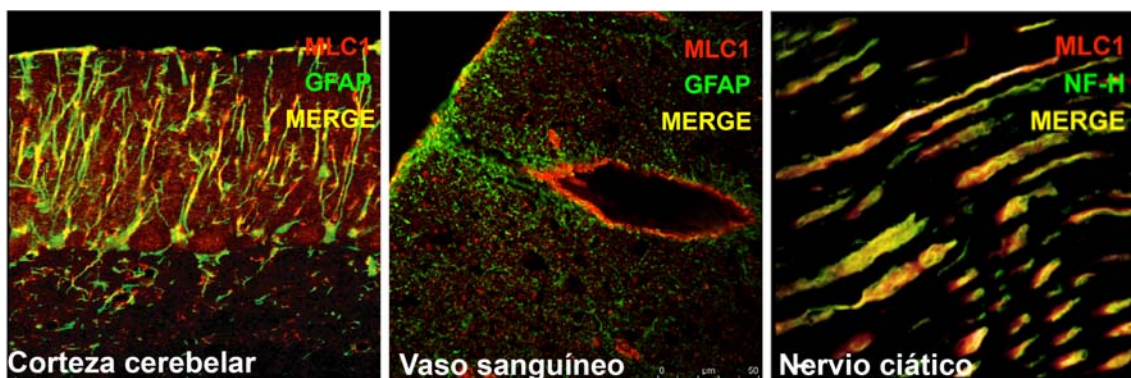
Otros estudios usando la metodología de doble híbrido mostraron que MLC1 interactuaba con la subunidad  $\beta$ -1 de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Brignone et al., 2011). Se detectó interacción entre la parte del extremo N-terminal de MLC1 y el dominio extracelular de dicha subunidad  $\beta$ -1 (Brignone et al., 2011). Como la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa está involucrada en el control osmótico intracelular y la regulación del volumen, estudiaron cómo un choque hiposmótico afectaba a la relación entre ambas proteínas. Encontraron que la hiposmolaridad incrementaba la expresión de MLC1 y favorecía la asociación entre las dos proteínas. Además, el choque hiposmótico inducía el hinchamiento celular del astrocito y la formación reversible de vacuolas derivadas de endosomas, donde las dos proteínas co-localizaban, sugiriendo que MLC1, a través de su interacción con la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa podría estar involucrada en el control intracelular de la osmolaridad así como en la regulación del volumen (Brignone et al., 2011).

Aunque el fenotipo que se observa en los pacientes de MLC sugiere que

MLC1 debe tener un papel en el movimiento de agua o iones a través de la membrana, la función de MLC1 sigue sin estar definida.

#### 2.4.4 Localización de MLC1 en tejido y en astrocitos.

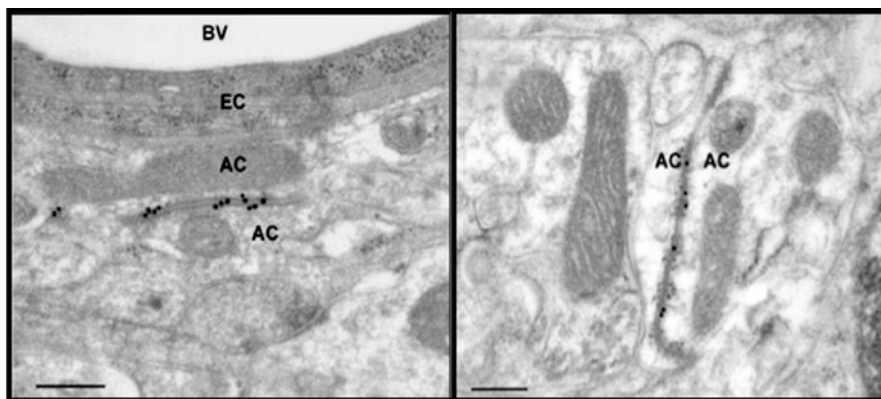
Diferentes estudios se han llevado a cabo con el fin de definir la localización de MLC1 tanto en cerebro de ratón como en tejido adulto humano mediante inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos policlonales (Boor et al., 2005), (Boor et al., 2007), (Ambrosini et al., 2008), (Duarri et al., 2008), (Duarri et al., 2011). Todos los estudios han detectado MLC1 principalmente en la glía de Bergman en el cerebelo, en células endoteliales rodeando los ventrículos y en astrocitos alrededor de las regiones subpial y perivascular. No se ha detectado expresión en microglía o en oligodendrocitos. Además, se confirmó la expresión de MLC1 obtenida por hibridación *in situ* (Teijido et al., 2004) en cuerpos celulares neuronales ahora por inmunohistoquímica en cerebro de ratón, ya que se detectaba expresión en diferentes tractos axonales durante los primeros estadios del desarrollo del sistema nervioso central (Teijido et al., 2007) (Figura 6).



**Figura 6: Localización de MLC1 en astrocitos y en fibras nerviosas.** Puede observarse marcaje de MLC1 en los procesos apicales de la glía de Bergmann en la capa molecular, y rodeando un vaso sanguíneo. Asimismo, se observa co-localización entre MLC1 y un marcador neuronal en el nervio ciático.

Sin embargo, no hay un acuerdo general entre los distintos grupos acerca de esta expresión neuronal. Puesto que la cantidad relativa de MLC1 es mucho más alta en astrocitos que en neuronas, es posible que otros laboratorios no hayan podido detectar dicha expresión neuronal, ya que podría existir una menor sensibilidad a la hora de la detección. No obstante, se necesita más investigación para poder explicar las discrepancias entre los diferentes patrones de expresión expuestos.

Gracias a la microcopía electrónica de alta resolución usando partículas de oro para realizar *immunogold*, se ha podido revelar que MLC1 está presente en uniones astrocitarias perivasculares y no en uniones entre el astrocito y la célula endotelial (tanto en tejido humano como de ratón) (Teijido et al., 2007), (Duarri et al., 2011) (Figura 7).



**Figura 7: Localización de MLC1 a nivel de microscopía electrónica.** Se observa que MLC1 se encuentra en uniones entre astrocitos, ya sea en zonas perivasculares o entre procesos astrogliales. Pero no en uniones en contacto directo con la lámina basal del vaso sanguíneo. Adaptado de (Teijido et al., 2007). AC: astrocito. EC: célula endotelial. BV: vaso sanguíneo.

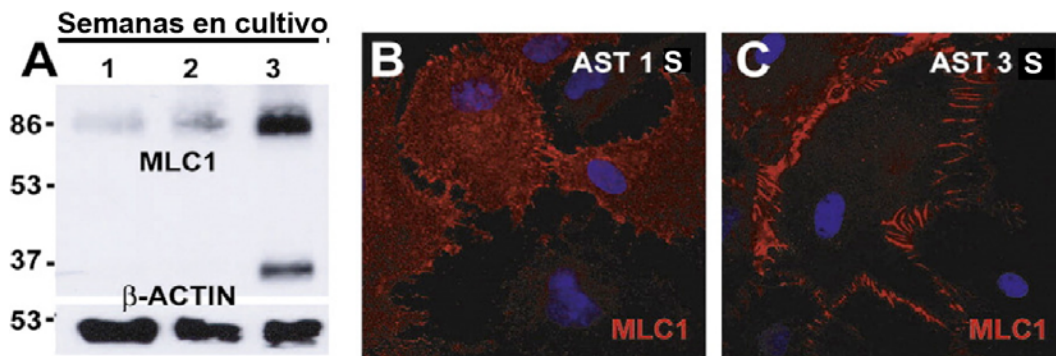
Doble *immunogold* en tejido humano entre MLC1 y  $\beta$ -Distroglicano (el cual está localizado en la membrana astrocitaria en contacto con la lámina basal) mostraba que ambas proteínas no co-localizaban (Duarri et al., 2011), por lo que se puede concluir que MLC1 no es un componente del complejo *distrophin-glycoprotein (DGC)*, ya que no está localizada justo en la membrana



en contacto con la célula endotelial, sino en los procesos astrocitarios que unen unos astrocitos con otros. Además, no se observaron cambios en la localización de MLC1 en varios cerebros de ratones *knock-out* para proteínas del DGC. Sin embargo, otros grupos sugerían que MLC1 sí formaba parte de este complejo, dado que mostraban co-localización de MLC1 con proteínas del DGC en los pies astrocitarios en contacto con los vasos sanguíneos (Boor et al., 2007), (Ambrosini et al., 2008). Sin embargo, en estos trabajos se usó microscopía confocal, y puesto que existe muy poca distancia entre la membrana astrocitaria y la de la célula endotelial, y entre las membranas en contacto entre astrocitos justo rodeando el vaso sanguíneo, tal vez esta técnica no ofrece suficiente resolución para poder discernir entre estas diferencias. Aún así, hay otros experimentos que relacionan a MLC1 con el DGC. Están basados en fraccionamiento bioquímico y co-inmunoprecipitación mediante el uso de agentes *cross-linkers* (Boor et al., 2007), (Ambrosini et al., 2008). Sin embargo, estudios de co-inmunoprecipitación sin estos agentes no conseguían detectar interacción entre MLC1 y los componentes del DGC (Duarri et al., 2011).

Por otro lado, se han desarrollado también estudios de localización de MLC1 en cultivos primarios de astrocitos de rata (Ambrosini et al., 2008), (Duarri et al., 2011). En ellos se ha detectado a la proteína MLC1 endógena de una manera difusa en el citoplasma, co-localizando con marcadores endosomales y del RE (Ambrosini et al., 2008). En cambio, tratando los astrocitos con compuestos que bloquean la proliferación celular o que causan diferenciación celular (por ejemplo, Ara-C) se consiguió observar una elevada expresión de MLC1 en cultivos de varias semanas, y más importante, era

capaz de detectarse a MLC1 en uniones entre astrocitos (Duarri et al., 2011) (Figura 8).



**Figura 8: Modelo celular astrocitario de MLC desarrollado por nuestro laboratorio (Duarri et al., 2011).** (A) Se observa cómo la expresión de MLC1 analizada por WB aumenta tras 3 semanas en cultivo. (B y C) Inmunocitoquímica de MLC1 en cultivo de astrocitos parados en ciclo con AraC. Después de 1 semana en cultivo, MLC1 presenta un marcaje difuso citoplasmático aunque también se localiza en la membrana astrocitaria (B). Después de 3 semanas en cultivo, MLC1 se localiza claramente en procesos astrocito-astrocito (C).

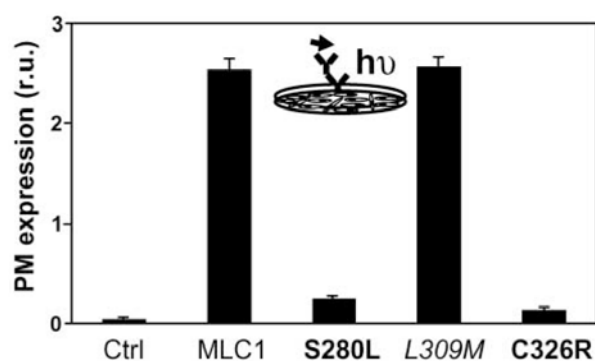
Este modelo de cultivo de astrocitos diferenciado ha sido usado como modelo de la enfermedad debido a que reproduce la misma localización que MLC1 presenta en tejido. Se ha visto que MLC1 co-localiza en dichos procesos astrocitarios con proteínas componentes de las uniones *tight*, como son *zonula occludens* (ZO-1) u ocludina; y también con componentes de las uniones adherentes, como son  $\beta$ -catenina o N-caderina (Duarri et al., 2011). En cambio, MLC1 no mostraba una co-localización completa con proteínas del DGC, ni con proteínas de uniones tipo *gap* ni de uniones focales en dichas uniones entre astrocitos (Duarri et al., 2011). Por el contrario, se observó co-localización de MLC1 con proteínas del DGC en compartimentos intracelulares en el modelo astrocitario indiferenciado (Ambrosini et al., 2008). Aunque existe controversia acerca de la exacta localización de MLC1 entre los distintos grupos, lo que nuestro grupo cree es que MLC1 lleva a cabo su función fisiológica en las uniones astrocitarias en la membrana plasmática. No obstante, es posible que cuando se encuentre intracelularmente pueda estar asociada a otras proteínas

como las que pertenecen al DGC, unificándose así las discrepancias entre los diferentes grupos.

Finalmente, la expresión de MLC1 en sistemas heterólogos (Teijido et al., 2004) (células HeLa o HEK transfectadas con la proteína MLC1 sola) revela que MLC1 se localiza principalmente alrededor de toda la membrana plasmática, sin concentrarse en uniones entre células.

## 2.5 MUTACIONES DE *MLC1*: MECANISMO MOLECULAR DE PATOGÉNESIS.

Varios grupos han estudiado diferentes mutaciones de *MLC1* en sistemas heterólogos, tras la incorporación de dichas mutaciones *missense* a través de mutagénesis dirigida. Lo que se ha observado es que la mayoría de las mutaciones *missense* muestran una disminución en su nivel de expresión en comparación con la proteína MLC1 salvaje. Asimismo, también muestran una menor llegada a la membrana plasmática (Figura 9) (Teijido et al., 2004), (Montagna et al., 2006), (Lanciotti et al., 2010).



**Figura 9:** Las variantes mutantes S280L y C326R de MLC1 presentan una afectación en la llegada a la membrana plasmática en comparación con la proteína salvaje. El polimorfismo L309M asociado con la esquizofrenia catatónica no presenta defecto en el tráfico a la membrana. Adaptado de (Teijido et al., 2004).

Por otro lado, también se pudieron validar muestras humanas de monocitos obtenidas de la sangre periférica de varios pacientes (Duarri et al., 2008), donde se pudo concluir que las mutaciones de MLC1 reducían los niveles de expresión de la proteína *in vivo*.

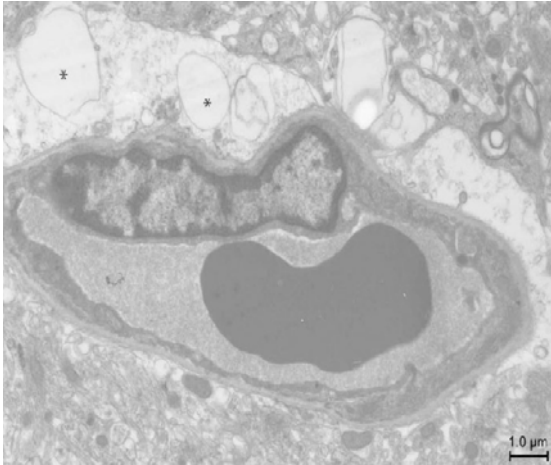
## **2.6 CONSECUENCIAS MOLECULARES DE LA PÉRDIDA DE MLC1.**

El estudio de diferentes mutaciones presentes en pacientes de MLC mostraba que la mayoría de ellas presentaban un reducido nivel de expresión. Por ello, para entender la patofisiología de la enfermedad, se han llevado a cabo diferentes estrategias con el fin de eliminar o reducir los niveles de expresión de la proteína MLC1.

La primera aproximación fue usar leucocitos de sangre periférica (PBLs) procedentes de pacientes, ya que se sabía que el mRNA de MLC1 se expresaba en ellos, aunque en una relación 1000 veces menor que la expresión del mRNA de MLC1 en el cerebro (Duarri et al., 2008). Así, se aislaron monocitos de estos PBLs procedentes de varios pacientes y se testaron por Western blot y no se detectó expresión de MLC1, mientras que sí se detectaba en los monocitos procedentes de pacientes control (Duarri et al., 2008). Desafortunadamente, la detección de MLC1 en las muestras control solo era posible cuando la sangre era fresca, lo cual limitaba el uso de estas células para otros estudios.

Por otra parte, como MLC1 se expresa mayoritariamente en astrocitos, se han desarrollado estudios en cultivo primario de astrocitos de rata eliminando la proteína (y el mRNA) usando la metodología del RNA de interferencia mediada por adenovirus (Duarri et al., 2011). Los astrocitos deplecionados de MLC1 presentaban vacuolización (Duarri et al., 2011). Sin embargo, las vacuolas que se habían observado en la biopsia del cerebro de un paciente se encontraban principalmente en la mielina (van der Knaap et al., 1996), por lo que el significado del resultado de la vacuolización astrocitaria no quedaba muy claro. Sin embargo, la reexaminación de la misma biopsia

permitió encontrar vacuolas en astrocitos en la zona perivascular (Figura 10). Por tanto, la vacuolización astrocitaria es ahora otra característica de la enfermedad (Duarri et al., 2011).



**Figura 10: Imágen de microscopía electrónica del cerebro de un paciente de MLC.** Se observa un pie astrocitario que está proyectando hacia un vaso sanguíneo. Contiene vacuolas (asteriscos). Adaptado de (Duarri et al., 2011).

La presencia de este fenotipo vacuolizante ha hecho que se intente encontrar algún defecto bioquímico o funcional que pudiera explicarla. Así, se han hecho estudios electrofisiológicos en líneas de linfoblastos procedentes de pacientes y en astrocitos deplecionados de MLC1 y éstos mostraban una menor actividad VRAC (Ridder et al., 2011). VRAC es responsable del flujo de osmolitos y de cloruro ante un choque hiposmótico (Ernest et al., 2005). Asimismo, el agua sigue al flujo de estos iones en un proceso denominado *Regulatory Volumen Decrease* (RVD) (Pasantes-Morales et al., 2006). Es posible que los astrocitos deplecionados de MLC1 no puedan en algún momento eliminar todo el agua (pues presentan una actividad RVD más lenta) y entonces opten por encapsularla en vacuolas, de manera similar a lo que se ha descrito en organismos inferiores (Becker et al., 1999). De esta manera, entendiendo una disminución en la actividad VRAC se podría potencialmente explicar la presencia de vacuolas de agua en estos astrocitos sin MLC1. Lo que

no se sabe cómo explicar es cómo se forman las vacuolas en la mielina. Esto podría ocurrir por un efecto no autónomo. Sin embargo, se necesitan más experimentos para clarificarlo. No obstante, la disminución de la actividad VRAC es el primer defecto funcional encontrado en la enfermedad MLC (Ridder et al., 2011). Aún así, la relación entre MLC1 y la actividad VRAC sigue siendo desconocida, puesto que esta actividad está regulada en múltiples niveles.

## **2.7 TRATAMIENTO PARA PACIENTES DE MLC.**

Debido al desconocimiento de las funciones que puede desempeñar la proteína MLC1, no es posible hasta el momento entender el mecanismo fisiológico de la enfermedad. Por ese motivo, no se ha podido desarrollar todavía ningún tratamiento para los pacientes de MLC. Solamente se les puede aplicar métodos paliativos de los diferentes síntomas de la enfermedad, o bien, disminuir la incidencia de estos síntomas gracias al diagnóstico prenatal.



### **3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

Las adhesiones celulares están involucradas en muchos aspectos del desarrollo cerebral, como son los procesos de migración neuronal, la formación del axón, la formación de las sinapsis y la formación del complejo glial que rodea a los axones y las sinapsis (Togashi et al., 2009). Además, también son importantes para una correcta morfología cerebral así como para las funciones cerebrales altamente coordinadas, como son la memoria y el aprendizaje (Sanes and Lichtman, 1999), (Yamagata et al., 2003), (Washbourne et al., 2004).

Los contactos de adhesión célula-célula puede llevarse a cabo a través de interacciones homofílicas o a través de interacciones heterofílicas. Estas moléculas interactúan unas con otras entre las distintas células y activan una serie de vías de señalización. Por eso, algunas de estas moléculas se definen como moléculas de adhesión y otras, como moléculas de señalización (Togashi et al., 2009).

A continuación se mostrarán un conjunto de moléculas involucradas en las interacciones neurona-neurona, o bien, neurona-glía en el sistema nervioso.

#### **3.1 CADHERINAS.**

Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio y constituyen una superfamilia con más de 100 miembros en vertebrados. Se clasifican en cadherinas clásicas, cadherinas no clásicas y protocadherinas.

Las cadherinas clásicas son proteínas con un único dominio transmembrana que presentan en su región extracelular 5 dominios cadherina



(EC), los cuales contienen secuencias que están involucradas en la unión a calcio (Takeichi, 2007). También presentan una secuencia conservada de reconocimiento de adhesión celular His-Ala-Val (HAV) en el dominio EC1 (Sakisaka and Takai, 2005). Estos dominios cadherina están involucrados en interacciones en *cis* o *trans* entre los dominios extracelulares de otras moléculas, así como permiten la unión homofílica entre las mismas moléculas de cadherina (Takeichi, 2007). Si se elimina un fragmento de la parte extracelular de la proteína N-cadherina, ésta funciona como un dominante negativo, pues se inhibe su capacidad de adhesión celular (Togashi et al., 2009). Por su cola citoplasmática interaccionan con las cateninas ( $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina o catenina p120), las cuales conectan éstas con el citoesqueleto de actina. Los complejos cadherina-catenina son capaces de regular la polimerización de actina, característica que es muy importante para el mantenimiento de la adhesión celular.

N-cadherina es necesaria para la migración neuronal cortical in vivo. Se expresa tanto en neuronas que migran como en las fibras de la glía radial, y está involucrada en la interacción entre ambos tipos celulares, controlando el enganche de las neuronas a las fibras de glía radial. (Shikanai et al., 2011). N-cadherina es internalizada y reciclada a la membrana plasmática a través de las vías de endocitosis mediadas por Rab5 y Rab11. De esta manera, se consigue un nivel óptimo de N-cadherina en la superficie de la membrana plasmática, promoviendo así la migración neuronal (Shikanai et al., 2011).

Las cadherinas también pueden funcionar como receptores para generar las señales mediadas por contacto con el sitio diana del axón, ya que se sabe que las interacciones cadherina-cadherina son capaces de activar moléculas

de señalización a través de su cola citoplasmática, como por ejemplo las pequeñas Rho GTPasas. Por tanto, las cadherinas pueden también funcionar como moléculas de señalización (Takeichi, 2007).

A nivel ultraestructural, estas proteínas se encuentran en las sinapsis de muchas regiones del sistema nervioso, formando estructuras simétricas de adhesión en las uniones *puncta adherentia* de las sinapsis (Togashi et al., 2009). Durante el desarrollo, los complejos cadherina-catenina se acumulan en los contactos de filopodios tempranos axo-dendríticos y se conservan en la mayoría de sinapsis maduras (Togashi et al., 2009). A pesar de que se sabe que las cadherinas están involucradas en la formación de sinapsis, no son suficientes para formarlas *in vitro*, ya que se han hecho ensayos con células no neurales expresando N-cadherina, y éstas no consiguen inducir diferenciación pre-sináptica en axones en los sitios de contacto (Togashi et al., 2009).

Además, se especula que la localización determinada de las cadherinas podría estar regulada por otras moléculas de adhesión, como son las nectinas (Takeichi, 2007). Así, la nectina 1, preferentemente localizada en el axón, interacciona con la nectina 3, localizada en la dendrita. Esto promueve el reclutamiento de las cadherinas hacia los sitios de contacto sinápticos. Este reclutamiento ocurre a través de interacciones moleculares entre afadina y  $\alpha$ -catenina, las cuales se unen a nectina y al complejo cadherina- $\beta$ -catenina respectivamente. Por tanto, las nectinas potencian la acumulación de las cadherinas en los espacios axodendríticos (no en los contactos dentro-dendríticos). Las cadherinas por sí solas no pueden alcanzar esta especializada localización.

Entre las cadherinas no clásicas de vertebrados destacan las proteínas CELSR2 y CELSR3. Están involucradas en la morfogénesis neuronal. Cuando la función de CELSR2 es suprimida por medio de RNA de interferencia en rodajas corticales o cerebelares de cerebro de rata, la complejidad de la arborización dendrítica está disminuida. Como CELSR2 tiene la habilidad de interactuar homofílicamente, se ha propuesto que su interacción ocurre entre neuritas y por eso es importante para el mantenimiento de la ramificación dendrítica (Takeichi, 2007).

Las protocadherinas se caracterizan porque presentan un número variable de dominios EC y porque su cola citoplasmática no interacciona con las cateninas (Wu and Maniatis, 1999). Varias protocadherinas se expresan en el sistema nervioso y algunas de ellas se localizan en las sinapsis (Togashi et al., 2009). Existen múltiples isoformas de protocadherinas. Su compleja organización genómica y su *splicing* alternativo ha hecho que se especule con que su elevada diversidad es la base de su especificidad sináptica (Weiner et al., 2005). Sin embargo, las funciones biológicas de la mayoría de las protocadherinas son desconocidas.

### **3.2 NECTINAS.**

Las nectinas representan una familia de moléculas de adhesión del tipo *immunoglobulin-like (Ig-like)* independientes de calcio, la cual consta de 4 miembros (nectina 1, 2, 3 y 4). Se caracterizan por poseer una región extracelular con 3 dominios *Ig-like*, una región transmembrana de paso único y una cola citoplasmática (Takai and Nakanishi, 2003). En este tipo de moléculas

de adhesión, la afadina es la proteína responsable de unir las nectinas al citoesqueleto de actina.

Las nectinas regulan múltiples funciones celulares, como son la polaridad celular, el movimiento, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la formación de uniones adherentes y estrechas, y la entrada de virus a las células. Esto lo hacen en cooperación con otras CAMs, con integrinas, con receptores de membrana, con moléculas que se parecen a las nectinas (Necls), y con la afadina (Takai et al., 2008), (Ogita et al., 2011).

Las nectinas muestran una actividad de adhesión celular independiente de calcio. Cada nectina forma primero homo-dímeros en *cis* y luego homo- o hetero-dímeros en *trans* a través de la región extracelular, dando lugar a adhesión celular. Las uniones heterotípicas forman uniones de adhesión más fuertes que las que se obtienen con las interacciones homotípicas (Togashi et al., 2009). Así, la hetero-interacción en *trans* entre la nectina 1 y la nectina 3 es la interacción más fuerte entre las nectinas (Sakisaka and Takai, 2004). Éstas también son capaces de interactuar en *trans* heterofílicamente con moléculas similares a ellas (Necls) a través de sus regiones extracelulares (Takai et al., 2003), (Sakisaka and Takai, 2004), (Kurita et al., 2011). Las nectinas inducen activación de Cdc42 y Rac (en contraste con E-cadherina, que induce activación de Rac pero no de Cdc42) (Yap and Kovacs, 2003), dando lugar a formación de filopodios y lamelipodios.

La nectina 1 y la nectina 3 se localizan asimétricamente en los lados pre y post-sinápticos respectivamente en las uniones *puncta adherentia*. En cambio, la afadina está presente en ambos lados sinápticos (Mizoguchi et al., 2002), (Takai and Nakanishi, 2003), (Takai et al., 2008).

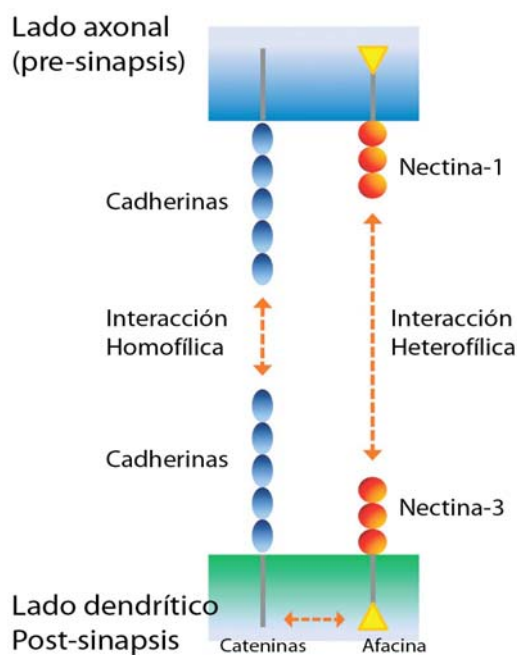
Las nectinas también participan en la trayectoria de los axones comisurales (Sakisaka and Takai, 2004). Así, la nectina 1 y 3 se localizan asimétricamente en el lado axonal comisural y en la placa del suelo respectivamente. Su interacción es crítica para los contactos entre los axones comisurales y las células de la placa del suelo; y por tanto para la correcta trayectoria de estos axones (Takai et al., 2008).

La sobreexpresión de nectina 1 causa su deslocalización en dendritas e induce asociaciones atípicas dendro-dentríticas así como axo-dendríticas (Togashi et al., 2006). Por el contrario, la delección de nectina 1 hace que se pierdan los contactos entre los axones y las espinas dendríticas, disminuyendo el número de uniones *puncta adherentia* (Beaudoin, 2006). Asimismo, en un ratón deficiente en afadina, se observa un menor número de este tipo de uniones en las sinapsis. Estos resultados indican un importante papel del sistema nectina-afadina en la formación de las sinapsis.

La sobreexpresión de nectina 3 tiene pocos efectos. De hecho, la interacción homofílica entre nectina 3 es menos efectiva, y además es menos eficiente en reclutar  $\beta$ -catenina en los contactos comparado con nectina 1. Por tanto, nectina 3 no funciona como una molécula de adhesión fuerte sino que funciona principalmente siendo pareja heterofílica de nectina 1. Una vez que los niveles de nectina 3 llegan a la saturación con respecto a nectina 1, moléculas adicionales de nectina 3 no ejercen efectos biológicos adicionales (Togashi et al., 2006).

Las nectinas median el paso inicial de los contactos entre axones y dendritas. Posteriormente, reclutan a las cadherinas para formar las uniones sinápticas maduras (Ogita et al., 2010). Si se bloquea el sistema cadherina-

catenina se perturba la diferenciación sináptica, pues esta estructura es importante para el ensamblaje de estructuras subcelulares sinápticas, la estabilización de contactos sinápticos y para el remodelaje sináptico dependiente de actividad (Togashi et al., 2006). Asimismo, el complejo nectina-afadina permite el ensamblaje de moléculas en la zona activa de la pre-sinapsis, como son Bassoon, Piccolo, CAST y RIM1; o de moléculas como PSD-95 y S-SCAM en la zona densa post-sináptica (Ogita et al., 2010). La expresión de las nectinas por tanto, promueve la expresión de cadherinas en dichas uniones. Y a su vez, esta sobreexpresión de las cadherinas también podría ser un requisito para que las nectinas lleven a cabo sus funciones (Togashi et al., 2006). Por consiguiente, la localización de la nectina 1 en el axón y su interacción en *trans* con la nectina 3 (en la membrana post-sináptica), en cooperación con los complejos cadherina-catenina es crítico para la asociación ordenada de axones y dendritas, y por tanto, para la formación de las sinapsis (Sakisaka and Takai, 2004), (Togashi et al., 2009).



**Figura 11: Composición molecular de la sinapsis.** Muchas moléculas de adhesión poseen un motivo de unión que se une a proteínas PDZ. Adaptado de Togashi et al (Togashi et al., 2009).

### **3.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (CAM) DE LA SUPERFAMILIA DE INMUNOGLUBULINAS (Ig).**

Las CAMs de la superfamilia de las Ig son complejos de proteínas transmembrana capaces de mediar interacciones moleculares múltiples a través de sus regiones extracelulares, mientras que sus dominios citoplasmáticos se unen reversiblemente al citoesqueleto de actina (Maness and Schachner, 2007), (Schmid and Maness, 2008). El dominio extracelular de las IgCAMs puede ser cortado enzimáticamente por medio de miembros de la familia de proteínas ADAM (una desintegrina y metaloproteasa), dando lugar al enriquecimiento de la matriz extracelular con fragmentos IgCAM funcionalmente activos.

Dado su diversidad estructural, los miembros de la superfamilia Ig están involucrados en diferentes aspectos de la neurohistogénesis; por ejemplo, juegan un papel clave en la migración radial y tangencial de los precursores neuronales, en la arborización de las neuritas y en la guía axonal dependiente de contacto, así como en la estimulación e inhibición de la extensión de las neuritas dependiente de contacto (Brummendorf and Rathjen, 1996). También participan en la estabilización de las sinapsis.

La expresión solapada de las proteínas IgCAMs durante el desarrollo sugiere que estas proteínas podrían estar funcionando cooperativamente. Además, estas moléculas se caracterizan porque forman múltiples interacciones, ya sea en *trans* o en *cis* y de manera homofílica o heterofílica.

#### **3.3.1 Familia L1-CAM.**

La familia L1 incluye a 4 proteínas transmembranas relacionadas: L1, CHL1 (*close homolog of L1*), NrCAM y neurofascina. A pesar de su similitud en

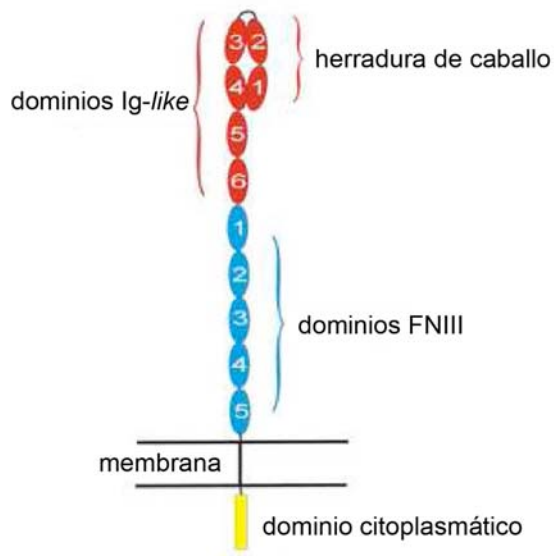
la estructura, las L1-CAMs solo comparten un 35 - 45% de homología (Schmid and Maness, 2008).

Las proteínas L1-CAM tienen 6 dominios *Ig-like* y entre 4 o 5 repeticiones de fibronectina III (FNIII) en sus regiones extracelulares, y un dominio citoplasmático más o menos conservado de alrededor 100 residuos, el cual es capaz de unirse al citoesqueleto de actina (Rathjen and Rutishauser, 1984).

- El peso molecular de la proteína **L1** varía entre 200 y 230 KDa, dependiendo del tejido del cual es extraída. La cola citoplasmática de la proteína L1 contiene una secuencia conservada (FIGQ/AY) que permite la unión reversible a anquirina, un adaptador de espectrina, que acopla L1 al citoesqueleto de actina (Maness and Schachner, 2007). Esta asociación se produce vía las proteínas ezrina-radixina-moesina.

Basado en la cristalografía de 2 homólogos de L1 (hemolina y axonina-1), se ha predicho que los 4 dominios *Ig-like* del extremo N-terminal de L1 adoptan una conformación en forma de herradura de caballo, en la cual el primer y el segundo dominio se pliegan para interactuar con el cuarto y el tercer dominio respectivamente (Figura 12). Esta conformación con forma de herradura podría ser requerida para su función, puesto que los primeros 4 dominios de L1 son necesarios y suficientes para la adhesión homofílica (He et al., 2009). El papel de los dominios FNIII en la adhesión no está claro todavía, aunque algunos resultados sugieren que están involucrados en interacciones *cis* que facilitarían otras interacciones heterofílicas u homofílicas. El tándem de 11 dominios consecutivos en la parte extracelular de L1 sugiere una estructura flexible y con capacidad de extensión.





**Figura 12: Representación esquemáticas de la molécula de adhesión L1.** Adaptación de (He et al., 2009).

Como muchas proteínas de adhesión, L1 se encuentra altamente glicosilada, con 21 sitios posibles de N-glicosilación en su ectodominio: 4 lugares en la región con forma de herradura, 5 lugares dentro del quinto y sexto dominio *Ig-like*, y 12 sitios más en los dominios FNIII. Los glicanos juegan un importante papel en la adhesión neural mediada por L1 y NCAM. Así, L1 puede unir ácidos siálicos en tales carbohidratos, actuando éstos en la regulación del crecimiento de las neuritas (Kleene et al., 2001).

He y colaboradores han propuesto un modelo estructural para la adhesión homofílica mediada por L1. Así, las dos herraduras provenientes de las proteínas L1 de ambas membranas opuestas interactúan en *trans* como parejas homofílicas. Además proponen que las interacciones laterales en *cis* resultan de interacciones entre los carbohidratos, o de interacciones entre proteína y carbohidratos (He et al., 2009).

Por otra parte, las integrinas actúan como parejas cooperantes de L1 para promover la adhesión celular y una motilidad direccional. Las integrinas son receptores de la superficie celular que interactúan con la matriz

extracelular (ECM) y transducen la señal desde la ECM hasta el interior celular. El reclutamiento de L1 incrementa la adhesión celular a proteínas de la matriz extracelular a través de diferentes subclases de integrinas, lo cual potencia la motilidad y la migración. Es interesante en este contexto el hecho que L1 activa transitoriamente a pp60 (C-Src), PI3K, el factor Vav2, la GTPasa Rac I y la quinasa activada por p21 en una vía que culmina en la activación de MEK y ERK. A su vez, la integrina  $\beta$ -1 transduce adhesión celular vía pp60, PI3K, Rac I y PAK I. Estos resultados sugieren que L1 podría señalizar a través de integrinas o que las vías podrían converger en los primeros pasos (Maness and Schachner, 2007), culminando en una activación incrementada de ERK (Schmid and Maness, 2008).

En el SNC, L1 se expresa mayoritariamente en los axones durante su formación, crecimiento y guía, y en menor medida en dendritas y soma. Así, L1 se expresa altamente durante el desarrollo del sistema nervioso presentando una compleja regulación. Durante el desarrollo L1 está involucrada en migración celular, guía axonal, crecimiento de las neuritas, fasciculación axonal y mielinización (Coman et al., 2005), (Kiryushko et al., 2004). Sin embargo, la disrupción del gen L1 no parece afectar a la mielinización de los nervios periféricos, indicando que L1 no es esencial para la mielinización (Haney et al., 1999).

Por otro lado, en ratones deficientes de L1, las neuronas corticales piramidales muestran una posición laminar anormal, así como una anormal proyección de los axones corticoespinales (presentan errores en la guía axonal). L1 es capaz de interactuar en *cis* en la membrana plasmática con neuropilina-1 (NP-1), el cual es un componente del complejo receptor de la

semaforina 3A, y lo hace a través de la secuencia FASNKL presente en el primer dominio *Ig-like* (Castellani et al., 2002), (Maness and Schachner, 2007). La repulsión mediada por la semaforina 3A requiere de interacciones en *cis* con L1 y NP-1, mientras que la unión en *trans* de L1 a dichos complejos L1-NP-1 convierte la repulsión axonal mediada por semaforina 3A en atracción axonal (Castellani et al., 2002). Por tanto, L1 participa en la guía axonal induciendo la conversión de efectos de repulsión en atracción. En el cerebelo, donde la migración neuronal ocurre de la misma manera y bajo los mismos mecanismos que en la corteza, L1 participa en la migración radial de las neuronas granulares, posiblemente en conjunción con NrCAM (Thelen et al., 2002).

La importancia de L1 se ve reflejada en las enfermedades neurológicas clínicamente variables debidas a mutaciones en L1 (Schafer et al., 2010). Un ejemplo es el síndrome L1 (Panicker et al., 2003). El espectro clínico de este síndrome incluye hidrocefalia, retraso mental, afasia y paraplejia espástica, entre otros síntomas (Weller and Gartner, 2001), (Schafer et al., 2010). Las mutaciones que afectan al dominio extracelular resultan en una mayor severidad clínica para los pacientes que aquellas mutaciones que afectan a la parte citoplasmática (Kenwrick et al., 2000). Lo que se ha observado es que las mutaciones *missense* encontradas en L1 interfieren con la unión homofílica y heterofílica de los ligandos de L1. Asimismo, existe una afectación del tráfico intracelular de la proteína, ya que queda retenida en el RE y existe una reducción de L1 en la superficie celular. También se ve afectado el crecimiento y arborización de las neuritas (Schafer et al., 2010).

Después de una lesión, L1 se sobrexprea en algunos tipos de neuronas modificando su capacidad regenerativa, como por ejemplo en las células

ganglionares retinales (Zhang et al., 2008a). Así, L1 también se expresa en las células gliales tras una lesión y también potencia la regeneración axonal. Además, se ha visto que en ratones con la médula espinal lesionada, la transfección de L1 en células madre embrionarias es capaz de reducir la muerte celular tras transplantarlas en dicha médula lesionada, así como potenciar la regeneración axonal (Chen et al., 2005). Esto hace que el estudio de L1 tenga un interés para promover aproximaciones terapéuticas en la recuperación funcional del SNC después de una lesión (Zhang et al., 2008a).

● **CHL1** (*close homolog of L1*), otra molécula de la familia L1-CAM, también es necesaria para el correcto posicionamiento laminar y la orientación dendrítica de las neuronas en áreas corticales posteriores (sobre todo en la corteza visual y somatosensorial), donde CHL1 se expresa mayoritariamente. Además, también tiene un papel en la guía axonal (Maness and Schachner, 2007). Como L1, CHL1 coopera con la integrina  $\beta$ -1 para estimular la migración axonal a través de pp60 c-src, PI3K y ERK. Así, una interacción heterofílica en *trans* con las integrinas  $\beta$ -1 sobre la glía radial podría transducir señales de migración en las neuronas corticales responsables del correcto posicionamiento laminar. CHL1 también es necesario para dirigir las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la capa más profunda hacia la superficie pial en las áreas corticales caudales (Maness and Schachner, 2007). Asimismo, CHL1 puede unirse al receptor de la semaforina 3A, la Neuropilina-1, a través de la secuencia conservada presente en el dominio Ig 1. De esta forma, actúa como un correceptor obligado para mediar el crecimiento del cono axonal inducido por semaforina 3A, así como la repulsión axonal. En este sentido, L1 y CHL1 actúan ambos como co-receptores con Neuropilina-1 en

neuronas piramidales diferenciadas, pudiendo promover la atracción apical de las dendritas en respuesta a la unión local homofílica, en presencia del gradiente cortical de la semaforina 3A (Maness and Schachner, 2007).

● **Nr-CAM** presenta una estructura similar a la de las moléculas de la familia L1-CAM. Sin embargo, no presenta serinas en su cola citoplasmática susceptibles a ser fosforiladas, como ocurre en L1. En cambio, en el dominio C-terminal contiene secuencias F-V, las cuales permiten su asociación a dominios PDZ de la familia ZO-1 (Grumet, 1997).

A pesar de esta similitud estructural con L1, Nr-CAM presenta un patrón de expresión más restrictivo (Sakurai et al., 2001). Así, Nr-CAM se expresa transitoriamente en estructuras ventrales (en la placa del suelo) durante el desarrollo del cerebro, donde ha sido implicada en la guía axonal a través de interacciones con proteínas relacionadas como TAG-1 (o contactina-2) (Sakurai et al., 2001).

Nr-CAM funciona como un receptor neuronal para el crecimiento y extensión de las neuritas gracias a estímulos promovidos por contactina-1, neurofascina y el receptor tirosina fosfatasa  $\beta$  (RPTP $\beta$ ). Además, también se une a TAG-1 modulando la guía axonal. Nr-CAM también puede interactuar lateralmente con contactina-1 regulando el crecimiento axonal (Grumet, 1997), (Sakurai et al., 2001). Estas interacciones con distintas proteínas podrían explicar sus diferentes papeles durante el desarrollo del sistema nervioso en varias regiones incluyendo la médula espinal, el sistema visual, y el cerebelo (Sakurai et al., 2001), así como en la formación o mantenimiento de los nodos de Ranvier (Grumet, 1997).

Los axones comisurales que proyectan a través de la placa del suelo

expresan TAG-1 más fuertemente que L1 y Nr-CAM. Después de cruzar la placa del suelo, la expresión de TAG-1 disminuye y la de L1 aumenta. En la región dorsal de la médula espinal, Nr-CAM se expresa en la zona de entrada de la raíz dorsal en un patrón que cambia durante el desarrollo (Grumet, 1997). Así, la interacción heterofílica de Nr-CAM y TAG-1 puede ser importante en el desarrollo de la médula espinal, donde los axones comisurales que expresan TAG-1 interactúan con células de la placa del suelo que expresan transitoriamente Nr-CAM. Por tanto, TAG-1 y Nr-CAM tendrían un papel en la guía de axones comisurales. Como la guía axonal requiere de señalización celular, es posible que otras proteínas transmembrana participen en dicha guía axonal, ya que TAG-1 no presenta región citoplasmática (Grumet, 1997).

En el ratón KO para Nr-CAM, las neuronas granulares cerebelares son defectuosas en la respuesta *in vitro* a contactina (que induce la extensión de las neuritas) (Sakurai et al., 2001). Así, se ha implicado a Nr-CAM en el desarrollo del cerebelo, aunque su ausencia puede ser compensada por otras proteínas cercanas que desarrollen sus funciones, como son por ejemplo L1 y neurofascina (Sakurai et al., 2001). En este sentido, un ratón doble KO para L1 y Nr-CAM presenta una reducción del tamaño del cerebro y severos defectos cerebelares, los cuales son mucho mayores que la suma de lo que se observa en los ratones KO para L1 o Nr-CAM por separado.

En un reciente trabajo se ha identificado una nueva función para Nr-CAM y el receptor de Semaforina 3F Neuropilina-2 (Demyanenko et al., 2011). Se demuestra que NrCAM media guía repelente por semaforina 3F en el telencefalo ventral a través de neuropilina-2, y que la deficiencia de NrCAM causa una mala organización de las subpoblaciones axónicas motoras y

talámicas somatosensoriales de la corteza visual, quedando afectada la proyección de los axones talámicos de la corteza visual (Demyanenko et al., 2011).

- De los cuatro miembros de la familia L1-CAM, **neurofascina** es la única que tiene muchas variantes por *splicing* alternativo (Liu et al., 2011). Hay dos variantes mayoritarias de neurofascina, la isoforma glial NF155 y la isoforma axonal NF186.

Las IgCAMs juegan también un papel fundamental en la organización de los nódulos de Ranvier en los axones mielinizados (Labasque et al., 2011). En el SNP, las células de Schwann secretan una molécula llamada gliomedina (Gldn), capaz de unirse a moléculas pertenecientes a la familia L1-CAM como son la NrCAM glial y la isoforma axonal de neurofascina NF186 (Labasque et al., 2011). Además, esta molécula (gliomedina) también participa en el reclutamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) en dichos nódulos de Ranvier. NF-186 es la pareja axonal de Gldn para llevar a cabo este reclutamiento de Nav; en cambio, NrCAM solo es requerido en células gliales. La interacción de ambas IgCAMs con Gldn ocurre por los dominios de fibronectina FNIII (Labasque et al., 2011).

Durante el desarrollo, los canales de sodio (Nav) dependientes de voltaje son reclutados primeramente en los heminodos que bordean cada segmento de mielina, y posteriormente, en los nodos maduros que se forman por la fusión de dos heminodos. Este agrupamiento inicial de Nav en los heminodos requiere de la proteína NrCAM glial y de gliomedina, así como de su receptor axonal NF-186 (Feinberg et al., 2010). Por otro lado, los dominios Ig de NF-186 parecen estar implicados en interacciones heterofílicas ya sea en

*cis* o en *trans* con NrCAM (Labasque et al., 2011).

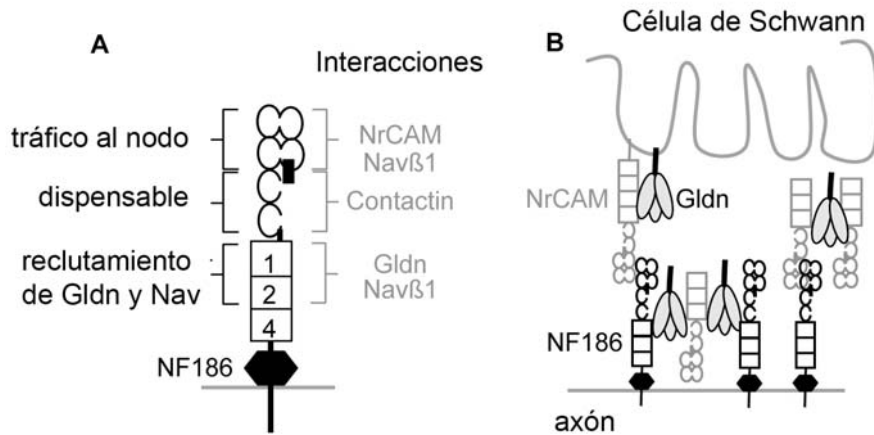
Se cree que NF-186 es crítico para el reclutamiento inicial de Gln en los heminodos. Sin embargo, NrCAM parece incrementar la afinidad de Gln por NF-186. Así, se podría considerar que NrCAM comienza asociándose en *cis* con Gln a través de los dominios FNIII por el lado glial, y entonces, este complejo promoverá una asociación multimérica, primero vía Gln con NF-186, y luego, dando lugar a la interacción entre NrCAM y NF-186 a través de los dominios Ig1-4.

En cambio, en los paranodos, es la isoforma glial de neurofascina NF-155 la que influye en la formación de uniones septadas a través de su asociación con el complejo axonal Caspr/Contactina-1 (Labasque et al., 2011). Esta interacción ocurre a través de los dominios Ig 5 y 6 de la NF-155. Por tanto, las isoformas de neurofascina NF-155 y NF-186 presentan diferentes funciones en la formación de los paranodos y nodos respectivamente.

Se ha descrito también que tanto NF-186 como Gln son capaces de unirse a proteoglicanos asociados a la matriz extracelular (Labasque et al., 2011). Así, NF-186 puede interaccionar con el condroitin-sulfato brevican, mientras que Gln es capaz de unirse tanto a heparan sulfato como a brevican.

En el siguiente esquema se muestra un modelo esquemático del ensamblaje de NF-186 y NrCAM con Gln en los nodos de Ranvier en los axones periféricos (Figura 13).





**Figura 13: Modelo de ensamblaje de NF-186 y NrCAM con Gldn en los nodos de Ranvier en los axones periféricos.** (A) Los dominios FNIII 1 y 2 de NF-186 median la unión a Gldn y a la subunidad  $\beta$ -1 de Nav. Los dominios Ig 5 y 6 de NF-186 son capaces de unirse a Contactina. Los dominios Ig 1-4 interaccionan con NrCAM y con la subunidad  $\beta$ -1 de Nav. Además, estos dominios son necesarios para el correcto posicionamiento de NF-186 a los nodos. (B) NrCAM y NF-186 se unen a Gldn a través de sus dominios FNIII 1 y 2 con la misma afinidad. NrCAM puede interactuar con NF-186 en cis y en trans vía los 4 primeros dominios Ig. Adaptado de (Labasque et al., 2011).

### 3.3.2 Contactinas.

Las contactinas son un subgrupo de moléculas pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresan exclusivamente en el sistema nervioso. Este subgrupo consta de 6 miembros: contactina 1, TAG-1, BIG-1, BIG-2, NB-2 y NB-3. Las moléculas que han sido más estudiadas son contactina-1 y TAG-1 (también llamada contactina-2), sobre todo en el papel que ejercen en la adhesión celular neural, en el proceso de guía axonal durante el desarrollo y en la mielinización (Shimoda and Watanabe, 2009).

La estructura de las contactinas consiste en 6 dominios *Ig-like*, 4 dominios de fibronectina III, y un glicosilfosfatidilinositol que las ancla a la membrana plasmática. Debido a que las contactinas no poseen una cola citoplasmática, necesitan asociarse en *cis* con otras proteínas transmembrana para poder transducir las señales extracelulares a través de la membrana (Shimoda and Watanabe, 2009).

- La contactina-1 se expresa en el cerebelo post-natal en células granulares. Durante la migración de estas células, contactina-1 cambia su distribución celular, pues reduce su expresión de los cuerpos celulares y permanece expresada en las extensiones axonales. Por tanto, contactina-1 participa en el control de las interacciones axón-dendritas entre interneuronas cerebelares (Shimoda and Watanabe, 2009).

- En cambio, TAG-1 comienza a expresarse en periodos muy tempranos durante el desarrollo. Así, se expresa transitoriamente en un conjunto de neuronas y fibras comisurales de la médula espinal, en el ganglio de la raíz dorsal en células ganglionares de la retina, así como en fibras corticofugales (Shimoda and Watanabe, 2009). Así, se ha implicado a TAG-1 en la migración tangencial de estas neuronas y de las interneuronas corticales (Shimoda and Watanabe, 2009). Se ha visto que si se bloquea TAG-1, se reduce la expresión de interneuronas GABAérgicas en la corteza. Sin embargo, la migración de estas interneuronas ocurre de manera normal en un ratón KO para TAG-1, sugiriéndose que deben existir otras moléculas que compensen la ausencia de TAG-1.

Por otra parte, la expresión de TAG-1 es importante para la supervivencia de neuronas en algunos núcleos pre-cerebelares. Su expresión también es esencial para la estructura normal de los axones de las células retinales ganglionares y de las células gliales que están a su alrededor (Shimoda and Watanabe, 2009). Por tanto, se requiere de una expresión próxima de contactina-1 y TAG-1 para una normal morfogénesis del cerebelo.

Además, tanto contactina-1 como TAG-1 juegan un importante papel en la formación de los nódulos de Ranvier (Shimoda and Watanabe, 2009). En

estas interrupciones se localizan en gran número los canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales son hetero-oligómeros compuestos por una subunidad  $\alpha$  formadora del poro y al menos una subunidad  $\beta$ . Las subunidades  $\beta$  de estos canales incrementan la expresión funcional de los mismos así como modulan la apertura de la subunidad  $\alpha$ , pudiendo actuar también como molécula de adhesión, ya que presentan en su región extracelular un dominio *Ig-like*. La subunidad  $\beta 2$  muestra homología con contactina-1, y la subunidad  $\beta 1$  puede asociarse con ella (con contactina-1). Esta asociación potencia la expresión en superficie de dichos canales de sodio.

Contactina-1 se expresa en el paranodo donde es capaz de interaccionar con proteínas asociadas a contactinas, como por ejemplo con Caspr, y con la neurofascina-155 glial. Contactina-1 se une a Caspr en *cis*, y su interacción es esencial para la salida de Caspr del retículo endoplasmático e insertarse en la membrana plasmática. Por tanto, contactina-1, Caspr y NF-155 son esenciales para la formación de los paranodos (Shimoda and Watanabe, 2009).

Por otra lado, TAG-1 co-localiza en los yuxtaparanodos con Caspr2 y con los canales de potasio *Shaker*. Caspr2 puede alcanzar la membrana plasmática sin necesidad de TAG-1 (en contra de lo que le ocurre a Caspr, que necesita de contactina-1 para salir del RE). Así, TAG-1 se asocia en *cis* con Caspr2 y en *trans* consigo misma, pero con otra TAG-1 que se localice en la membrana glial. Este complejo es necesario para el reclutamiento de los canales de potasio en los yuxtaparanodos (Shimoda and Watanabe, 2009). Mientras que Caspr2 sólo se expresa en neuronas, TAG-1 se expresa tanto en neuronas como en células gliales. Se sugiere que la interacción en *trans*

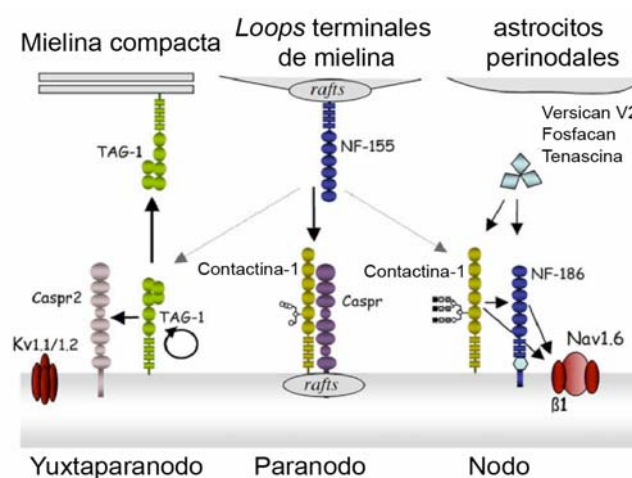
homofílica de TAG-1 podría ser el primer paso en la formación del complejo yuxtaparanodal, siendo crítica para agrupar a los canales Kv1 en la membrana axonal (Savvaki et al., 2010), (Gu and Gu, 2011). Posteriormente ocurriría una unión en *cis* de la TAG-1 axonal con la Caspr2 axonal (Savvaki et al., 2010). Por tanto, Caspr2 no es indispensable para el reclutamiento inicial de Kv1. Podría estar involucrada posteriormente, en los últimos pasos del direccionamiento de TAG-1/Kv1 a los yuxtaparanodos (Gu and Gu, 2011). La fosforilación en la tirosina 458 del canal Kv1.2 juega un importante papel en el reclutamiento de dichos canales mediada por TAG-1, ya que mutaciones en dicho residuo o el bloqueo de la fosforilación interrumpen la mielina y el reclutamiento mediado por TAG-1 de los canales axonales Kv1.2 en los yuxtaparanodos (Gu and Gu, 2011).

Otras interacciones moleculares de las contactinas son:

- L1 se une a TAG-1 en *cis* y a contactina-1 en *trans*.
- NrCAM se une en *trans* a TAG-1 y ambas proteínas se unen en *cis* y en *trans* a contactina-1.
- Contactina-1 puede asociarse con tenascinas y con RPTP $\beta$ .
- TAG-1 puede asociarse a N-CAM, Nr-CAM, L1,  $\beta$  integrinas, RPTP $\beta$  y a los proteoglicanos neurocan y fosfacan.

Para resumir cómo influyen las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas en la formación de los nódulos de Ranvier tenemos que la región yuxtaparanodal requiere a TAG-1 y Caspr2 para reclutar a los canales de potasio *Shaker* Kv1; que las uniones paranodales dependen de las interacciones entre 3 IgCAMs (contactina-1, Caspr y NF-155 sobre la célula glial); y que en el nodo se encuentra NF-186 y contactina-1 en el SNC o

NrCAM en el SNP. Asimismo, en el SNP también está gliomedina, importante para el reclutamiento de los canales de sodio (Labasque and Faivre-Sarrailh, 2010). En el SNC, la matriz extracelular cercana al nodo contiene Versican N2, el cual es secretado por el astrocito perinodal. Este versican es capaz de asociarse con tenascinas y fosfacan. Este complejo de proteínas de la matriz se asocian con NF-186 y contactina-1, siendo esto crucial para el reclutamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje en dichos nodos (Figura 14).



**Figura 14:** Esquema resumen donde se muestra la localización de canales iónicos y moléculas de adhesión de la superfamilia Ig-CAM en los distintos subdominios del nódulo de Ranvier en el SNC. Adaptado de (Labasque and Faivre-Sarrailh, 2010).

### 3.4 OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

#### 3.4.1 AMOG.

La molécula de adhesión glial AMOG fue inicialmente descrita por mediar adhesiones neurona-glía con una función crítica en la migración de las neuronas granulares en el cerebelo durante el desarrollo (Boer et al., 2010).

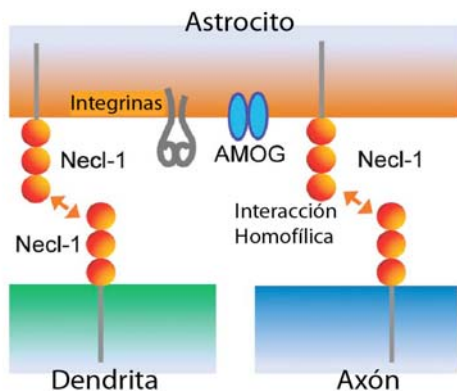
AMOG se expresa durante el desarrollo prenatal cortical, especialmente durante el periodo migracional, pero también se expresa en el cerebro adulto con mayor expresión en regiones de alta densidad de cuerpos celulares neuronales (Boer et al., 2010). Así, se sugiere que AMOG se puede encargar de promover la extensión de las neuritas de neuronas hipocampales y

cerebelares. También se piensa que puede influenciar en la parada de la migración neuronal debida al contacto entre la glía y la neurona. Esto se ha sugerido porque la migración neuronal cerebelar se ve inhibida por el uso de un anticuerpo monoclonal contra AMOG, lo cual sugiere un papel de AMOG en la migración y en la organización cortical (Boer et al., 2010). En cerebro adulto humano, AMOG se expresa en procesos gliales, sobre todo en el *endfeet* astrocitario perivascular, sugiriéndose un posible papel de AMOG en la regulación de la integridad vascular.

Asimismo, se ha identificado a AMOG como una proteína homóloga de la subunidad beta de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Gloor et al., 1990). AMOG o las variantes de dicha subunidad beta funcionan como elementos de reconocimiento para proteínas de adhesión que posteriormente vincularán dicha adhesión con transporte iónico (Gloor et al., 1990).

### 3.4.2 Necl-1.

Necl-1 (o SynCAM3) presenta una estructura similar a las nectinas, y se localiza en los contactos entre axón-astrocito. Necl-1 presenta una adhesión homofílica independiente de calcio y la capacidad de interactuar heterofilicamente con Necl-2, nectina-1 y nectina-3. Necl-1 no se une a afadina. Sin embargo, no se sabe cuál es la función precisa que Necl-1 realiza.



**Figura 15: Moléculas de adhesión presentes en los astrocitos que participan en la sinapsis.** Necl-1 se localiza en los sitios de contacto entre los axones terminales y los procesos gliales e interactúan homofílicamente. Adaptado de Togashi et al (Togashi et al., 2009).

### 3.4.3 Neuroliquina.

Neuroliquina es una proteína con un dominio esterasa-*like* situada en el lado post-sináptico. Interacciona en *trans* con  $\beta$ -neurexina, que es una proteína con un dominio globular laminina y que está en el lado pre-sináptico en las uniones sinápticas. Su interacción promueve la formación de especializaciones pre-sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas *in vitro*. Sin embargo, las neuroliquinas son indispensables para la maduración y la transmisión sináptica, pero no para la formación inicial de la sinapsis (Togashi et al., 2009).

### 3.4.4 El receptor de efrina (*Eph receptor*) tirosina quinasa y sus ligandos efrinas (Eph).

Los ligandos efrina están agrupados en 2 familias:

- Los ligandos efrina A (EphA) están anclados a la membrana por fosfatidilinositol y se unen a los receptores de efrina A.
- Los ligandos efrina B (EphB) son proteínas transmembranas que se unen preferencialmente a los receptores de efrina B.

Los receptores EphB se localizan en las sinapsis, y ahí, se unen a la subunidad NR1 del receptor de glutamato NMDA a través de su dominio extracelular. La estimulación de los receptores de EphB por los ligandos de efrina resulta en un incremento en la densidad sináptica y en un flujo de calcio mediado por los receptores de NMDA.

### 3.4.5 MAG.

MAG es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Presenta 5 dominios extracelulares del tipo Ig-*like*, un dominio transmembrana

y una cola citoplasmática corta.

La glicoproteína asociada a la mielina MAG es producida exclusivamente por los oligodendrocitos en el SNC y por las células de Schwann en el SNP. Se expresa en la capa más interna de la vaina de mielina, en contacto directo con la superficie axonal.

Aunque no es necesaria para la mielinización, MAG promueve la estabilidad entre el axón y la mielina, ayuda a estructurar los nodos de Ranvier y regula el citoesqueleto de actina. Además, MAG inhibe la regeneración axonal después de una lesión (Schnaar and Lopez, 2009). Así, el ratón KO para MAG expresa mielina de forma normal, pero sufre degeneración axonal a largo término. También presenta alterada la estructura del citoesqueleto axonal y una distribución alterada de los canales y moléculas de adhesión en los nodos de Ranvier, existiendo un solapamiento entre las regiones paranodales y yuxtaparanodales (Schnaar and Lopez, 2009).

Los efectos biológicos producidos por MAG comienzan cuando se une a sus receptores complementarios en la superficie del axón, como son los sialoglicanos GD1 y GT1b y miembros de la familia del receptor de Nogo. Sin embargo, existe controversia acerca del papel de estos receptores sobre las funciones de MAG (Schnaar and Lopez, 2009).





#### **4. CANALES DE CLORURO GLIALES.**

Los canales de  $\text{Cl}^-$  en el cerebro median diferentes procesos como por ejemplo la regulación de la excitabilidad neuronal y del volumen celular.

Existen diferencias en la distribución de  $\text{Cl}^-$  entre astrocitos y oligodendrocitos. Los oligodendrocitos tienen una menor acumulación de  $\text{Cl}^-$  que los astrocitos. Normalmente hay una clara correlación entre la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  en estado de reposo y la distribución de los iones  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana. Así, una alta permeabilidad en estado de reposo tiende a una menor acumulación del anión, al no poder equilibrar el flujo pasivo mediado por el canal. Al contrario, una baja permeabilidad da lugar a la acumulación de cloruro. Se piensa entonces que hay una baja conductancia al  $\text{Cl}^-$  en estado de reposo en los astrocitos, y al revés, una alta permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  en estado de reposo en los oligodendrocitos (Walz, 2002), (Kimelberg et al., 2006).

El conocimiento molecular actual de los canales de  $\text{Cl}^-$  presentes en células gliales es aún muy limitado. Los canales de  $\text{Cl}^-$  clonados en la actualidad pueden agruparse en 5 subtipos (Valverde, 1999), (Park et al., 2009):

1. El canal de  $\text{Cl}^-$  CFTR.
2. Los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia TMEM16.
3. Los canales que dan lugar a poros selectivos a  $\text{Cl}^-$  regulados por los ligandos GABA y glicina (*ligand-gated chloride channels*).
4. Los canales de  $\text{Cl}^-$  de la familia CLC.
5. Las bestrofinas.

De estos canales, sólo CIC-2, los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por GABA y glicina, alguno de los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (TMEM16B y TMEM16C) y la bestrofina 1 se sabe que se expresan en el cerebro (Walz, 2002), (Park et al., 2009). Asimismo, otros canales de  $\text{Cl}^-$  que actúan en las células gliales son los canales implicados en la regulación del volumen celular. Son los denominados canales VRACs, para los cuales no se conocen las entidades moleculares.

Nos centraremos preferentemente en CIC-2, ya que ha sido el canal de  $\text{Cl}^-$  que hemos encontrado durante la realización de esta Tesis doctoral y ha sido con el canal que hemos trabajado. Igualmente, se comentarán algunas características de la actividad VRAC, ya que ha sido recientemente relacionada con MLC1 (Ridder et al., 2011).

## **4.1 EL CANAL CIC-2.**

### **4.1.1 Generalidades de CIC-2.**

CIC-2 pertenece a la familia de canales y transportadores CLC. Ésta presenta nueve miembros en mamíferos, los cuales muestran una distribución tisular diferencial, y funcionan tanto en la membrana plasmática como en las membranas de orgánulos intracelulares (Jentsch et al., 1999).

CIC-2 es un canal de  $\text{Cl}^-$  expresado de manera ubícua, presentando una alta expresión en intestino, estómago, glándulas salivares, corazón, riñón y cerebro. Se ha sugerido que CIC-2 podría tener distintas funciones dependiendo del órgano donde se exprese (Hinzpeter et al., 2006).

En el cerebro, CIC-2 se detecta en neuronas, siendo mayor su expresión en neuronas hipocampales piramidales y menor en algunas interneuronas

(Smith et al., 1995). También se ha descrito expresión de CIC-2 en pies terminales astrocitarios contactando con capilares y arteriolas en capas específicas del hipocampo (Sik et al., 2000), así como en oligodendrocitos (Blanz et al., 2007).

A nivel celular, CIC-2 se expresa en las membranas basolaterales de células polarizadas *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, una gran proporción del canal se detecta intracelularmente (Niemeyer et al., 2004). Cuando CIC-2 se encuentra intracelular, se ha sugerido que está asociado a estructuras intracelulares membranosas, mientras que cuando CIC-2 se encuentra en la membrana celular aparece en agregados y posiblemente asociado a balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Cornejo et al., 2009).

#### **4.1.2 Relación estructura-función de CIC-2.**

El canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2 se abre lentamente en condiciones de hiperpolarización, y puede ser activado y modulado por acidificación externa (máxima actividad a pH 6). También se activa por hinchamiento celular debido a hipotonicidad (Clayton et al., 1998), (Smith et al., 1995), (Jentsch et al., 1999), (Zuniga et al., 2004), (Hinzpeter et al., 2006).

Como en otros canales CLC, se piensa que en CIC-2 existen 2 mecanismos de apertura: uno rápido y otro lento. Así, se cree que un cambio conformacional en el canal que da lugar a una apertura lenta en CIC-2, es también capaz de facilitar un mecanismo de apertura rápida (Zuniga et al., 2004).

Se ha sugerido que la región C-terminal regula la apertura de CIC-2 (Garcia-Olivares et al., 2008). Así, se ha observado que CIC-2 es funcional

incluso en la ausencia del dominio completo C-terminal, el cual contiene 2 dominios CBS (cystathionine-beta-synthase). No obstante, la apertura y el cierre del canal es más rápida. En cambio, la presencia de un solo dominio CBS mantiene al canal en una conformación cerrada. Por tanto, los dominios presentes en el C-terminal modulan la cinética de apertura y cierre de CIC-2. Dado que la apertura del canal trae consigo que los iones  $\text{Cl}^-$  salgan fuera de la célula, esto puede hacer que ésta se despolarice y de lugar a un recurrente potencial de acción. La regulación mediada por el dominio C-terminal podría tener un papel fisiológico en la estabilización de la excitabilidad neuronal retrasando la activación rápida y lenta de CIC-2.

#### **4.1.3 Proteínas que interaccionan con CIC-2 y regulación.**

Se han intentado buscar proteínas que pudieran estar asociadas con CIC-2, y que pudieran influir sobre su actividad. Así, se ha encontrado que la proteína Hsp90 está asociada a CIC-2 y da lugar a una sobreexpresión de la actividad del canal (Hinzpeter et al., 2006). Por un lado, la inhibición de Hsp90 da lugar a una menor llegada de CIC-2 a la membrana plasmática y a una reducción de la amplitud de la corriente mediada por CIC-2. Esta asociación puede tener importantes consecuencias patofisiológicas, dando lugar a una mayor actividad de CIC-2 en respuesta a situaciones de estrés celular, como elevada temperatura, isquemia o agentes oxidantes. Sin embargo, las bases moleculares de esta interacción (si es directa o indirecta) aún no han sido dilucidadas.

Varios estudios han sugerido que el tráfico endosomal y el reciclaje de CIC-2 está parcialmente mediado por vías dependientes de rab5 y rab11

(Dhani et al., 2008), (Cornejo et al., 2009). Asimismo, se ha observado que CIC-2 es objeto de una rápida endocitosis mediada en parte por la tirosina 179 presente en un *loop* intracelular, y que solo una proporción reside en los *lipids rafts* (Cornejo et al., 2009). Se ha sugerido también que el estrés metabólico, como la depleción de ATP, induce un incremento de la expresión de CIC-2 en la superficie celular debido a una reducción en su internalización por endocitosis (Dhani et al., 2008).

#### **4.1.4 Funciones asociadas a CIC-2 en el cerebro.**

La función de CIC-2 no ha sido elucidada, pero diversos estudios han sugerido su participación en procesos de transporte epitelial, en la regulación del volumen celular, así como un papel en el control de la concentración intracelular de cloruro en neuronas que expresan los receptores inhibitorios de GABA (Clayton et al., 1998), (Smith et al., 1995), (Jentsch et al., 1999), (Zuniga et al., 2004).

El ratón KO para CIC-2 da lugar a degeneración retinal y testicular (Bosl et al., 2001). En el cerebro, se ha sugerido que CIC-2 esté implicado en la regulación de los efectos de la acción del receptor GABA<sub>A</sub>, controlando la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup>. Sin embargo, el ratón KO para CIC-2 no presenta epilepsia que era lo esperado según esta hipótesis. El trabajo de (Blanz et al., 2007) mostró que dicho ratón KO, con el tiempo, presentaba una vacuolización de la sustancia blanca en el cerebro y en la médula espinal. En los animales heterocigotos no se observaban cambios. La mielina afectada era la del SNC y no la del SNP. Presentaba vacuolas rellenas de líquido entre las vainas de mielina. Sin embargo, la morfología de las neuronas resultaba

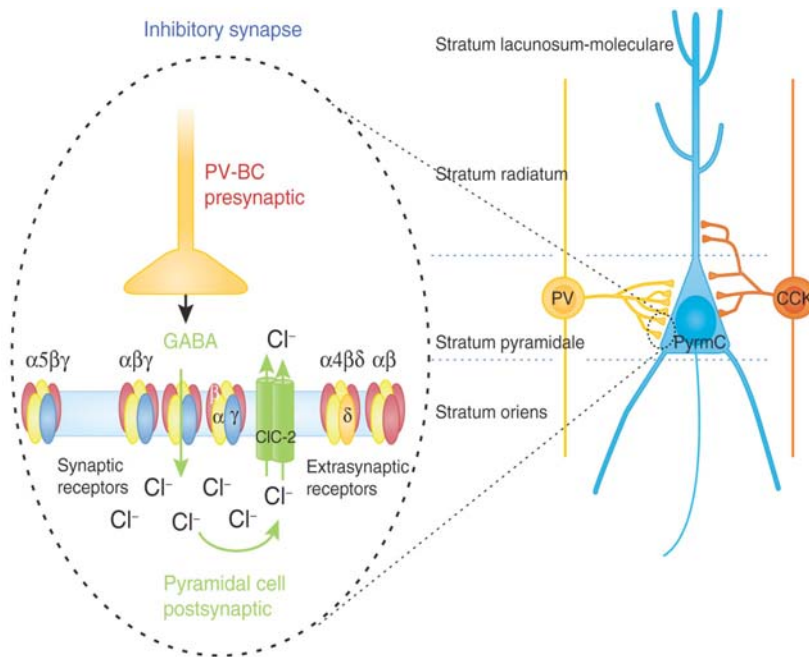
normal, y los déficits neurológicos resultaban suaves. En este trabajo se defiende la idea de que CIC-2 podría actuar tanto mediando un influjo como un eflujo de  $\text{Cl}^-$  en función del gradiente electroquímico. Dan un papel a CIC-2 en las células gliales en el mantenimiento de la homeostasis iónica en el SNC (Blanz et al., 2007).

Estudios recientes usando el ratón KO para CIC-2 han mostrado un defecto electrofisiológico asociado con la activación astrocitaria, viendo además evidencias de neurodegeneración en la capa CA3 del hipocampo (Cortez et al., 2010). Así, se defiende la posibilidad de que la expresión de CIC-2 juegue algún tipo de papel neuroprotector en el hipocampo adulto.

Rinke y colaboradores han encontrado que la corriente mediada por CIC-2 está involucrada en la extrusión de  $\text{Cl}^-$ , y que constituye una parte sustancial de la conductancia de  $\text{Cl}^-$  en reposo en las neuronas hipocampales (Rinke et al., 2010). La pérdida de CIC-2 da lugar a un gran incremento en la excitabilidad de las neuronas piramidales de la capa CA1. Asimismo, muestran que un conjunto de interneuronas media una corriente característica de CIC-2. La pérdida de CIC-2 en estas interneuronas da lugar a un incremento de excitabilidad, resultando en un aumento de la inhibición de las neuronas principales. Su trabajo da un papel dual a CIC-2 en las neuronas, regulando la excitabilidad y actuando como una vía adicional de eflujo de  $\text{Cl}^-$  (Rinke et al., 2010). Estos datos muestran el papel de CIC-2 en la homeostasis del  $\text{Cl}^-$  y creen que el efecto de la extrusión de  $\text{Cl}^-$  podría ser más relevante bajo condiciones de alta actividad neuronal.

Recientemente, se ha sugerido un nuevo papel de CIC-2. Se ha sugerido que CIC-2 participa en la regulación de las sinapsis de tipo PVBCs

(*parvalumin-expressing basket cells*) (Foldy et al., 2010). Así, CIC-2 es capaz de eliminar el  $\text{Cl}^-$  de las células piramidales durante una elevada actividad, el cual si no fuera por la actividad de CIC-2 podría quedar acumulado dentro de la célula (Figura 16).



**Figura 16: Típica sinapsis inhibitoria PV-BC (*parvalumin-expressing basket cells*).** Los diferentes receptores de GABA son expuestos a la liberación de GABA desde los terminales pre-sinápticos de las PV-BC. Se observa la proximidad del canal de  $\text{Cl}^-$  CIC-2, el cual permite el eflujo de  $\text{Cl}^-$  durante periodos de intensa actividad de las células *basket*; y que gracias a su papel, el  $\text{Cl}^-$  no se acumula dentro de la célula piramidal. Adaptado de (Smart, 2010).

En cambio, un estudio reciente defiende que CIC-2 produce corrientes *outward*, reduciendo directamente la excitabilidad (Ratte and Prescott, 2011). Para testar como CIC-2 funcionaba en neuronas reales, usaron *dynamic clamp* para insertar canales virtuales de CIC-2 en células piramidales de la capa CA1 de rata, con y sin los canales de CIC-2 bloqueados. Los experimentos confirmaron que CIC-2 reducía la transmisión sináptica inhibitoria. Es por ello que enfatizan la importancia de tener en consideración la fuerza impulsora al deducir cómo funciona un canal bajo condiciones fisiológicas (Ratte and Prescott, 2011). Para ellos, CIC-2 funciona bajo condiciones fisiológicas como una conductancia de escape o *leak* que directamente reduce la excitabilidad neuronal. Sus resultados contradicen la anterior visión de que CIC-2 constituye



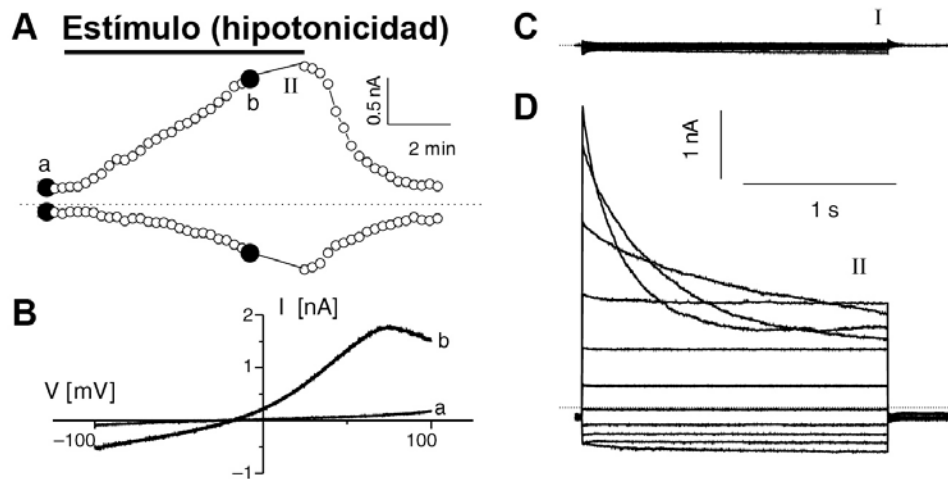
un eflujo de  $\text{Cl}^-$ . Concluyen por tanto, que CIC-2 puede mediar un influjo o un eflujo de  $\text{Cl}^-$  en función del gradiente electroquímico (Ratte and Prescott, 2011).

#### 4.2 ACTIVIDAD VRAC. CARACTERÍSTICAS.

Los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por un aumento del volumen celular han sido denominados VRACs (*volumen-regulated anion channels*). Se le han atribuido otras funciones aparte de la regulación del volumen (Nilius and Droogmans, 2003), como son la adhesión, el control del ciclo celular, la regulación del pH, etc.

Se activan parcialmente bajo condiciones isosmóticas, dando lugar a un fondo de conductancia de  $\text{Cl}^-$  que contribuye a determinar el potencial de membrana y la dirección de la fuerza impulsora para otros sistemas de transporte. Dependiendo del potencial de membrana y del potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$ , la activación de VRAC puede causar tanto despolarización como hiperpolarización (Nilius and Droogmans, 2003).

Las corrientes de VRAC muestran unas características biofísicas típicas. VRAC puede ser activado por diferentes estímulos además de por el incremento del volumen celular. Así, se activa por hipertonicidad, por hipotonicidad, por una reducción de la fuerza intracelular iónica, por la aplicación de *shear stress* o por la aplicación de  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  intracelular. Las corrientes a través de VRAC son moderadamente *outwardly rectifying* y presentan una inactivación a potenciales positivos. Se recuperan de esta inactivación a potenciales negativos. La conductancia de canal único es alrededor de 50-90 pS a voltajes despolarizantes y alrededor de 10 pS a potenciales hiperpolarizantes (Nilius and Droogmans, 2003).



**Figura 17: Características de la corriente mediada por VRAC.** (A) Time-course de la activación y desactivación de las corrientes a través de VRAC (medidas a  $-80\text{mV}$  y a  $+80\text{mV}$ ). La barra indica la aplicación de una solución 25% hipotónica. (B) Curva I-V obtenida a los puntos indicados en (A). (C) Trazas correspondientes bajo condiciones isosmóticas (corriente de fondo) tomadas al tiempo indicado por I en (A). (D) Trazas de corriente bajo condiciones hipotónicas (25%). Es la misma célula que en (C), tomada al tiempo indicado por II en (A). Nótese la inactivación a potenciales positivos. Adaptado de (Nilius and Droogmans, 2003).

El canal VRAC presenta la siguiente permeabilidad iónica:  $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{gluconato}$ . Además, VRAC proporciona una vía para el eflujo inducido por hipotonicidad de osmolitos orgánicos como aminoácidos (glutamato, aspartato, glicina) y polioles. VRAC también es permeable al lactato y al bicarbonato, lo que es consistente con un papel de VRAC en la regulación del pH (Nilius and Droogmans, 2003).

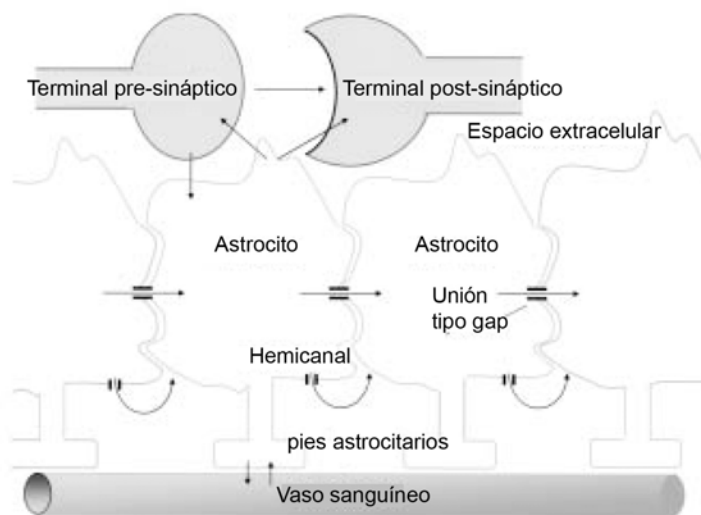
El canal VRAC no ha sido identificado a nivel molecular, pero su farmacología ha sido investigada extensamente. Así, VRAC es inhibido a concentraciones micromolares por clomifen, nafoxidina, tamoxifen, mefloquina, ácido araquidónico, quinina, quinidina, cromonas, 9-AC, NDGA, 1,9-dideoxiforscolina, diBA-5-C4, ácido niflúmico, mibefradil, NPPB. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos (si no todos) no son muy selectivos exclusivamente de VRAC. El compuesto más selectivo actualmente parece ser el DCPiB (Decher et al., 2001).

La activación de VRAC depende de la presencia de ATP intracelular, aunque su hidrólisis no es necesaria. Así, una baja concentración de ATP y una alta concentración intracelular de  $Mg^{2+}$  inhiben la actividad VRAC. Por otra parte, VRAC es modulado por fosforilación. Así, se ha observado que inhibidores de proteínas tirosina quinasas previenen la activación de VRAC y que la inhibición de proteínas tirosina fosfatasas da lugar a la activación de VRAC. Se sugiere con ello que la fosforilación de una tirosina es un paso necesario para una activación mantenida de VRAC (Nilius and Droogmans, 2003).

La identificación molecular de VRAC ha sido obstaculizada por la carencia de ligandos específicos de alta afinidad para el canal o por la ausencia de líneas celulares desprovistas de dicho canal. No obstante, varias proteínas han sido propuestas como candidatas a ser VRAC, como por ejemplo, la glicoproteína-P,  $p_{Cl_{in}}$  y CIC-3, las cuales han sido posteriormente descartadas. En conclusión, seguimos esperando la identificación molecular del canal de  $Cl^{-}$  VRAC.

## 5. FISIOLOGÍA ASTROCITARIA RELACIONADA CON MLC.

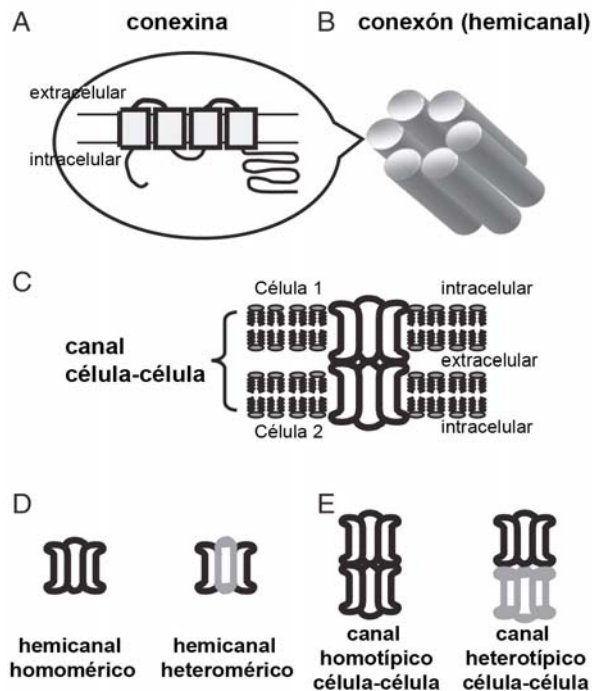
Los astrocitos son células estrelladas con largas prolongaciones que se ramifican formando una red tridimensional. Los procesos que emiten están polarizados en dos dominios funcionales, uno donde la parte más extensa de la membrana astrocitaria se encara hacia la sinapsis y contacta con ella; y otro, que se caracteriza por la formación de largos procesos que culminan en los pies astrocitarios terminales, los cuales envuelven a los capilares sanguíneos (Benarroch, 2005) (Figura 18).



**Figura 18: Polarización de los astrocitos en dos dominios funcionales:** uno hacia la sinapsis, y otro formando los pies astrocitarios que rodean los vasos sanguíneos. Los astrocitos están conectados unos con otros vía uniones tipo gap, formando un sincitio. Adaptado de (Benarroch, 2005).

Los astrocitos también están conectados unos con otros por medio de uniones tipo *gap*, formando una estructura organizada a modo de sincitio. Cada membrana celular contribuye con un hemicanal (o conexón) a la unión *gap* (Sargiannidou et al., 2010), (Abrams and Scherer, 2011). Cada conexón está formado por 6 conexinas que se disponen alrededor de un poro central. Los hemicanales individuales pueden estar compuestos por un único tipo de conexinas (homoméricos) o por distintos tipos (heteroméricos). Asimismo, las uniones *gap* se pueden formar con hemicanales iguales (unión homotípica) o distintos (unión heterotípica) (Figura 19). El diámetro del canal en las uniones

*gap* es de alrededor 1,2 nm, y permite la comunicación célula-célula gracias al paso de moléculas pequeñas de alrededor 1000 Da, como son iones, mensajeros secundarios, metabolitos, nucleótidos y pequeños péptidos (Sargiannidou et al., 2010). El mayor constituyente de estos hemicanales astrocitarios es la conexina 43.



**Figura 19: Nomenclatura de uniones gap.**

(A) Las conexinas son proteínas integrales de membrana con 4 dominios transmembrana y los extremos N y C terminales intracelulares. (B) Cada conexón o hemicanal está compuesto por 6 conexinas. (C) Las uniones *gap* dan lugar a canales que están compuestos por el anclaje de 2 conexones que provienen de células opuestas. (D) Si las 6 subunidades que forman el conexón son iguales (la misma conexina), el conexón se llama homomérico. Si el conexón está compuesto por distintas conexinas, es un hemicanal heteromérico. (E) Las uniones *gap* entre células se pueden formar mediante un mismo tipo de conexón (unión homotípica) o con distintos (unión heterotípica). Adaptado de (Abrams and Scherer).

Cada astrocito ocupa su propio espacio anatómico, siendo todo ese volumen de actuación su dominio funcional. Estudios recientes han definido que un único astrocito está en contacto con 4-8 somas neuronales y con 300-600 dendritas procedentes de diferentes neuronas (Benarroch, 2005), (Theodosis et al., 2008). Esta organización de los astrocitos es lo que se denomina como isla funcional de sinapsis, en la cual sinapsis vecinas pueden ser coordinadas por señales derivadas de una única célula astrocitaria. (Benarroch, 2005), (Halassa et al., 2007).

Los astrocitos desempeñan un amplio número de funciones además de su clásico papel de soporte de las neuronas, como son el control de la

homeostasis iónica y del agua del fluido extracelular, la regulación del metabolismo energético y la actividad sináptica. Además llevan a cabo una fina regulación de los niveles de glutamato y GABA en la sinapsis, se encargan de la detoxificación de amonio, la tamponación de la concentración extracelular de potasio y la regulación del volumen celular y el pH. Asimismo, proveen a las neuronas de nutrientes metabólicos, y acoplan la actividad sináptica con el riego sanguíneo local. Participan en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y están involucrados en la proliferación de células madres, así como son claves para la extensión de las neuritas y la migración axonal, participando también en la determinación del número de sinapsis. Protegen a las neuronas del estrés oxidativo, y propagan y modulan las señales excitatorias en el cerebro ya que son capaces de liberar gliotransmisores (Benarroch, 2005), (Oberheim et al., 2006), (Blackburn et al., 2009). Perturbaciones en las interacciones neurona-astrocito dan lugar a muchas enfermedades neurológicas, como la isquemia cerebral, la migraña, el edema cerebral, la encefalopatía hepática, y muchas otras enfermedades neurodegenerativas.

A continuación, y teniendo en cuenta las funciones astrocitarias que nosotros creemos afectadas en MLC, se va a desarrollar el papel que ejercen los astrocitos en el control del volumen celular y en el tamponamiento del potasio extracelular. Igualmente, se comentará la importancia de la formación de redes gliales entre astrocitos y oligodendrocitos para la homeostasis iónica en las proximidades de los axones mielinizados.

### **5.1 REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR.**

Las células animales tienen un volumen específico definido y caracterizado para cada tipo celular. El volumen celular puede ser modificado

cuando las condiciones externas de osmolaridad cambian o por cualquier otra condición que varíe la concentración intracelular de osmolitos. La membrana celular es muy permeable al agua, y por eso, cualquier alteración en la osmolaridad va seguida de flujos de agua en la dirección necesaria para restablecer el equilibrio osmótico, con el consecuente cambio de volumen. Así, el incremento del volumen celular es consecuencia de la reducción externa de osmolitos (hinchamiento hiposmótico) o debida a cambios en la distribución intracelular de osmolitos, en condiciones de osmolaridad externa constante (hinchamiento isosmótico). La contracción celular se da en condiciones de osmolaridad externa elevada producida por ejemplo por hipernatremia (elevado nivel de sodio en la sangre).

El volumen celular también está comprometido en condiciones fisiológicas por la generación y disipación de gradientes micro-osmóticos temporales y locales, generados por las funciones normales de la célula, como el transporte de nutrientes, la modificación del gradiente iónico de la membrana provocado por los neurotransmisores, la degradación de proteínas, la glicolisis, o la secreción vesicular.

Muchas células tienen la habilidad de responder al hinchamiento hiposmótico por mecanismos de recuperación del volumen, que se consigue gracias a la movilización de solutos acompañados de agua. Los iones intracelulares más abundantes ( $K^+$  y  $Cl^-$ ) junto con las moléculas orgánicas, son los osmolitos responsables del reajuste del volumen, denominado *regulatory volumen decrease* (RVD). En cambio, el RVD en condiciones de hinchamiento isosmótico está menos investigado, aunque es el más importante, ya que se produce tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas.

La reducción del volumen celular como consecuencia de una hiperosmolaridad o de unas condiciones que provoquen un encogimiento celular, también está regulado por la acumulación de iones esenciales ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y de osmolitos orgánicos. El proceso denominado *regulatory volumen increase* (RVI) está a cargo de los co-transportadores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y de transportadores específicos de aminoácidos y polialcoholes (Kimelberg, 2004b), (Kimelberg, 2004a), (Kimelberg et al., 2006), (Pasantés-Morales et al., 2000a), (Pasantés-Morales et al., 2000b), (Pasantés-Morales and Morales Mulia, 2000), (Jayakumar and Norenberg, 2010), (Jayakumar et al., 2011).

Las alteraciones en el volumen celular en el cerebro pueden tener consecuencias dramáticas. Los límites de expansión impuestos por el cráneo son mínimos para amortiguar un aumento del volumen cerebral, hecho que puede provocar una compresión de los vasos sanguíneos y causar episodios de hipoxia e isquemia, comprometiendo la función y supervivencia neuronal.

Los astrocitos son muy permeables al agua y ésta fluye a través de su membrana dirigida por el gradiente de presión osmótica o favorecida bidireccionalmente por la presencia de aquoporinas (AQP4). En condiciones de hiposmolaridad, el astrocito se comporta como un osmómetro perfecto y la magnitud de hinchamiento de ésta es proporcional a la reducción osmótica. Así, canales iónicos, transportadores y canales de agua (AQP4) son las moléculas implicadas en el aumento del volumen celular astrogliar y en el mecanismo asociado de RVD (Kimelberg, 2005).

La exposición de los astrocitos a hipotonicidad *in vitro* ha brindado avances en el conocimiento del mecanismo RVD, el cual puede resumirse que ocurre en 3 etapas temporalmente distintas (Benfenati and Ferroni, 2010):



- 1) La creación de un gradiente intracelular de osmolitos causa un hinchamiento celular debido a que el agua es conducida osmóticamente hacia dentro de la célula por difusión pasiva a través del canal AQP4.
- 2) Los astrocitos hinchados perciben el cambio de volumen, lo cual dispara una cadena de reacciones bioquímicas con el objeto de devolver a la célula a su homeostasis y que recupere su volumen celular.
- 3) Los mecanismos efectores de osmotransducción promueven la liberación de osmolitos inorgánicos, osmolitos orgánicos y agua, lo cual permite la recuperación del volumen.

Entre los mecanismos astrogliales propuestos para la percepción del volumen, se ha sugerido que el aumento intracelular del calcio intracelular inducido por hipotonicidad y los cambios en el citoesqueleto son claves en dicha percepción (Benfenati and Ferroni, 2010).

Un trabajo reciente indica que en respuesta a isquemia, los astrocitos llevan a cabo diferentes propiedades en el ajuste de volumen, sugiriendo que existen al menos 2 poblaciones funcionales de astrocitos en el córtex (Benesova et al., 2009): la primera población muestra un gran incremento en el volumen; y la segunda, un pequeño incremento. Estas dos poblaciones responden de manera diferente ante una isquemia. Sugieren que la expresión diferencial del canal de potasio Kir4.1 y GFAP, así como diferencias en la acumulación de taurina podría contribuir a la diferente habilidad de los astrocitos a regular su volumen (Benesova et al., 2009).

Existe evidencias de que al menos *in vitro* los canales aniónicos regulados por volumen (VRACs) juegan un papel crítico en la respuesta astrogliar al hinchamiento celular contribuyendo al RVD (Kimmelberg et al.,

2006). Otros estudios han revelado la presencia de canales de cloruro *inward rectifying* de la familia CLC que podrían contribuir a la homeostasis del volumen (Ferroni et al., 1997), (Makara et al., 2003). Hay también evidencias que el eflujo de  $K^+$  mediado por canales juega también un importante papel en el RVD (Benfenati and Ferroni, 2010) (aunque dichos canales de  $K^+$  involucrados no estén todavía identificados). El canal de  $K^+$  Kir4.1 es esencial para la regulación del hinchamiento celular en los pies astrocitarios terminales en la médula espinal (Dibaj et al., 2007), pero no existen evidencias de este mecanismo en otras regiones del SNC todavía.

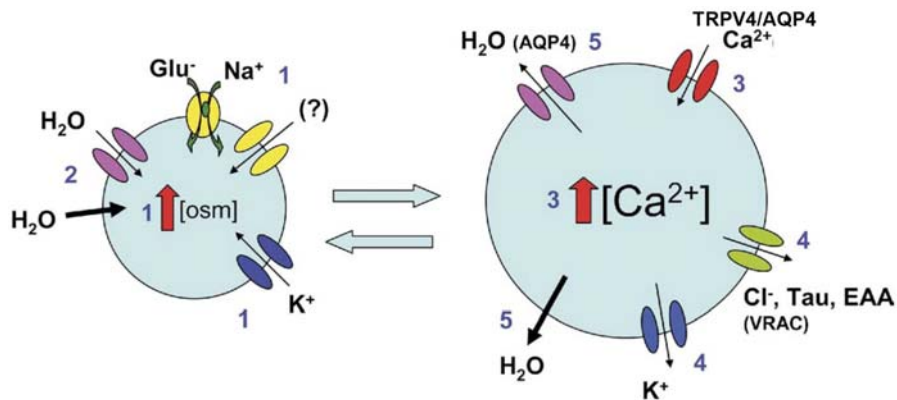
En astrocitos en cultivo, el hinchamiento celular activa las corrientes de VRAC, las cuales, además de promover flujos de aniones inorgánicos a través de la membrana, media el flujo de pequeñas moléculas orgánicas osmóticamente activas, como la taurina, ATP y aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato (Kimelberg et al., 1990), (Pasantes-Morales and Martin del Rio, 1990), (Pasantes-Morales et al., 1990), (Kimelberg et al., 2006). La activación de VRAC en respuesta al hinchamiento celular podría exacerbar el daño neuronal a consecuencia de un mecanismo excitotóxico debido a un eflujo incontrolado de glutamato (Benfenati and Ferroni, 2010). Una de las dificultades de estudiar los efectos mediados por VRAC es la ausencia de bloqueantes selectivos del canal así como activadores. Se ha propuesto recientemente al compuesto DCPIB como una molécula que tiene un cierto grado de especificidad para suprimir la corriente astrogliar mediada por VRAC, así como capaz de reducir el hinchamiento celular inducido y la liberación de glutamato que ocurre durante una isquemia (Zhang et al., 2008b). Tampoco se sabe si VRACs representan una única población de canales activados por

volumen, o que sean diferentes entidades moleculares que puedan ser activadas bajo diferentes condiciones (Liu et al., 2006). Estudios *in vitro* han mostrado evidencias de una interacción funcional entre AQP4 y VRAC, ya que tras disminuir la expresión de AQP4 mediada por siRNA se observó que la actividad VRAC estaba disminuida (Benfenati et al., 2007).

Se ha sugerido que la respuesta astrogial de RVD es dependiente de un aumento de la concentración de calcio intracelular. Algunos miembros de la superfamilia TRP podrían ser candidatos para mediar el aumento de calcio intracelular inducido por el hinchamiento celular (Pasantés-Morales et al., 2006). Así, los subtipos 1 y 4 de los canales TRPC han sido identificados en cultivos de astroglia (Malarkey et al., 2008).

En células de mamíferos existen otros canales catiónicos no selectivos que han sido identificados como osmo- y mecano-sensibles. Son los canales TRPV1, TRPV2 y TRPV4. Se sugiere su implicación en la percepción y en los mecanismos de transducción de los estímulos osmóticos. Así, varias observaciones indican que el canal TRPV4 está críticamente involucrado en la homeostasis del volumen celular y en el RVD en varios tipos celulares, incluido astrocitos corticales de rata (Liu et al., 2006), (Pan et al., 2008), (Becker et al., 2009), (Becker et al., 2005), (Benfenati et al., 2007). Asimismo, TRPV4 se expresa abundantemente en las membranas astrocitarias terminales en contacto con los vasos sanguíneos, en dominios también enriquecidos con AQP4. Un trabajo reciente (Benfenati et al., 2011) sugiere que el complejo AQP4 y el receptor TRPV4 constituye un elemento clave en la homeostasis del volumen cerebral. Funcionaría como un osmosensor acoplado al estrés osmótico a las cascadas de señalización intracelulares. De esta manera se

conecta el sensor de la señal con el mecanismo de respuesta (Benfenati et al., 2011).



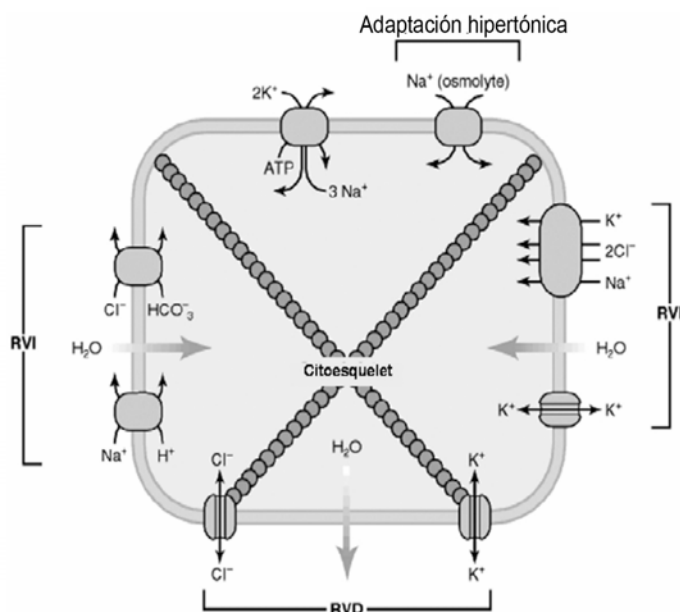
- 1) Aumento en la concentración intracelular de osmolitos
- 2) Entrada de agua e hinchamiento osmótico
- 3) Percepción del aumento de volumen y osmotransducción
- 4) Salida de osmolitos inorgánicos y orgánicos
- 5) Salida de agua y recuperación del volumen

**Figura 20: Hinchamiento astroglial y posibles rutas para promover la recuperación del volumen durante el RVD.** Los astrocitos ajustan su volumen celular como consecuencia de la actividad neuronal. En los pies astrocitarios, el  $K^+$ , el  $Na^+$  y el glutamato es recaptado por el astrocito por medio del canal Kir4.1, los co-transportadores Na/Glu y quizá por algún otro canal catiónico que aún se desconoce (?) (1). Este incremento en la concentración intracelular de osmolitos va acompañado por la entrada osmótica de agua a través de difusión pasiva y del canal AQP4 (2). El mecanismo que percibe el aumento en el volumen celular da lugar al proceso llamado *regulatory volume decrease* (RVD). El aumento en la concentración intracelular de calcio inducida por el hinchamiento celular podría estar implicado en la osmotransducción (3). También se ha sugerido que el complejo TRPV4/AQP4 está implicado en la osmotransducción (3). El proceso de RVD se basa en la extrusión de solutos intracelulares con el eflujo obligado en paralelo de agua. Los canales VRAC tienen un papel crítico en el RVD, permitiendo la salida de  $Cl^-$ , taurina (Tau) y aminoácidos excitatorios (EAA) como aspartato y glutamato. Un eflujo de  $K^+$  también es requerido pero un canal de  $K^+$  sensible a volumen implicado aún no ha sido identificado (4). La extrusión de solutos crea un gradiente para el eflujo de agua, permitiendo la recuperación del volumen inicial (5). No se han incluido las bombas y transportadores que contribuyen al movimiento de iones a través de la membrana. Adaptado de (Benfenati and Ferroni, 2010).

La contracción de los astrocitos en condiciones de hiperosmolaridad induce el RVI. En este mecanismo están implicados el co-transportador NKCC, y los intercambiadores  $Na^+/H^+$  y el  $Cl^-/HCO_3^-$ . La célula a su vez inhibe los canales y transportadores de salida de  $K^+$  y  $Cl^-$ .

NKCC1 es un transportador que juega un importante papel en mantener los niveles intracelulares de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$ . Así, se le asocian dos importantes

funciones: participar en la recaptación de  $K^+$  del espacio extracelular durante la actividad neuronal, y ser un importante contribuidor del mecanismo de RVI que participa tras la contracción celular debida a un choque hiperosmótico (Zhao et al., 2004). NKCC1 también participa durante el hinchamiento celular después de una lesión *in vitro*. En el trabajo de (Jayakumar et al., 2011) se ha mostrado que la actividad de NKCC1 aumenta después de un trauma en astrocitos en cultivo, y el bloqueo de su actividad con butenamida o su silenciación con siRNA da lugar a la atenuación de dicho hinchamiento celular inducido (Jayakumar et al., 2011). Así, se ha sugerido que bloquear la actividad de NKCC1 podría representar una estrategia terapéutica útil para tratar las primeras fases del daño cerebral traumático.



**Figura 21: Respuesta homeostática para mantener el volumen celular.**

Está dirigida por la actividad de canales y transportadores iónicos. La contracción celular es contrarrestada por el RVI, activando el co-transportador NKCC, el intercambiador  $Na^+/H^+$  y el  $Cl^-/HCO_3^-$  y movilizandolos iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  junto con agua hacia el interior celular, provocando un incremento en el volumen. El hinchamiento celular es compensado por el RVD, que involucra la activación del co-transportador KCC y los canales de  $Cl^-$  y  $K^+$  activados por volumen, haciendo salir los iones, los osmolitos y el agua de la célula recuperando el volumen inicial. Adaptado de (Kahle et al., 2009).

## 5.2 TAMPONACIÓN DEL POTASIO EXTRACELULAR.

Los astrocitos son células muy móviles y presentan una elevada plasticidad estructural, sobre todo en sus procesos más distales, los cuales pueden llevar a cabo cambios morfológicos muy rápidos, remodelando la

geometría y las propiedades de difusión del espacio extracelular y de las sinapsis (Theodosis et al., 2008).

La actividad sináptica neuronal libera  $K^+$  al medio extracelular. El cerebro está preparado para resistir concentraciones de  $K^+$  de 3 mM (Moghaddam and Adams, 1987), pero puede incrementarse hasta 10-12 mM (tras estimulación eléctrica). En condiciones patológicas, los niveles de  $K^+$  pueden alcanzar hasta 80 mM. Por tanto, la concentración extracelular de potasio necesita una fina regulación ya que su acumulación en el espacio extracelular puede alterar la excitabilidad neuronal, la liberación de neurotransmisor, el metabolismo de la glucosa y el riego sanguíneo cerebral (Theodosis et al., 2008).

La conductancia catiónica de la membrana astrocitaria es altamente selectiva para el  $K^+$  (Newman, 1986), y en concentraciones normales de  $K^+$  extracelular, éste se encuentra cerca del equilibrio electroquímico a través de la membrana. Si la concentración extracelular de  $K^+$  aumenta, el equilibrio se rompe y el  $K^+$  tiende a entrar a la célula. Pero esta entrada de solo  $K^+$  no es suficiente. Se requiere también de una absorción de  $Cl^-$  para compensar cargas. Asimismo, existe un intercambio de  $K^+$  por  $Na^+$  a través de la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa (expulsa 3 iones  $Na^+$  e introduce 2 iones  $K^+$  hacia dentro de la célula).

Existen 2 mecanismos de tamponamiento de potasio principales (Benarroch, 2005), (Rash, 2010):

a) Tamponamiento espacial de potasio o *potassium siphoning*. Depende de la alta permeabilidad de los astrocitos a los iones  $K^+$  y a la presencia del sincitio astrocitario gracias a las uniones tipo *gap*. Los astrocitos expresan múltiples canales de potasio. Destaca particularmente el *inward rectifying Kir*

4.1 (canal más expresado en los astrocitos). La débil rectificación que presenta permite que el movimiento de  $K^+$  sea bidireccional, hacia dentro o hacia fuera de la célula en función del gradiente de  $K^+$  transmembrana. Este canal se expresa tanto a nivel de las sinapsis como en los pies astrocitarios rodeando los capilares. Mediante este canal (y otros), los astrocitos transfieren el potasio desde los sitios de acumulación a lugares con menor concentración para finalmente llevarlo a los vasos sanguíneos. Esto lo llevan a cabo mediante un flujo de corriente a través de la red glial, el cual puede ser reversible. Kir4.1 presenta en su extremo C-terminal un motivo PDZ. Así, co-localiza con sintrofina, una proteína perteneciente al complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGC). También co-localiza con las proteínas de anclaje PSD95 y SAP97 (Benfenati and Ferroni, 2010). En los pies astrocitarios, el canal Kir4.1 co-localiza con AQP4. Esta co-expresión es importante porque un eficiente tamponamiento de  $K^+$  del espacio extracelular va ligado a un transporte paralelo de agua. AQP4 co-localiza también con las moléculas del DGC (Benfenati and Ferroni, 2010). Además, el anclaje de AQP4 a sintrofina parece ser clave para que la AQP4 lleve a cabo su función, ya que en ratones KO de sintrofina, existe una considerable pérdida de AQP4 en la membrana perivascular del pie astrocitario, y los ratones presentan un retraso en el tamponamiento del  $K^+$  extracelular causado por una actividad neuronal sostenida. Sin embargo, la distribución de Kir4.1 permanece inalterada. Asimismo, el ratón KO de AQP4 presenta una menor capacidad para la reabsorción de  $K^+$ . Además, en dicho ratón tampoco se ve alterada la distribución de Kir4.1 ni sus propiedades funcionales, lo que implicaría que estas moléculas no presenten una interacción funcional como se pensaba (Ruiz-Ederra et al., 2007), (Zhang and

Verkman, 2008). De igual manera, en un modelo celular en cultivo de células astrogiales hipocampales a los cuales se les ha reducido la expresión de Kir4.1 a través de RNA de interferencia o por inhibición farmacológica del canal con bario, la permeabilidad al agua de AQP4 no se ve modificada (Zhang and Verkman, 2008). Una posible explicación podría ser que estas dos proteínas no pertenezcan al mismo microdominio de la membrana plasmática resistente a detergentes (*lipid rafts*). Se deberían focalizar nuevos estudios en las propiedades de conductancia de Kir4.1 en astrocitos que están rodeando los vasos sanguíneos comparándolas con aquellas donde el canal se encuentra en astrocitos cerca de las sinapsis. Pudiera ser que Kir4.1 ejerza diferentes funciones en las distintas regiones (Benfenati and Ferroni, 2010). En el trabajo reciente de (Chever et al., 2010) se promueve la idea de que Kir4.1 no presenta un papel predominante en la absorción del potasio, aunque sí defienden que este canal es esencial para una eficiente tamponación del  $K^+$ .

Para el tamponamiento espacial de  $K^+$  son muy importantes las uniones *gap*. Así, el incremento del  $K^+$  extracelular ocurrido durante una alta actividad neuronal durante una isquemia, incrementa los niveles de expresión tanto de AQP4 como de Cx43 (Ribeiro Mde et al., 2006). Otra prueba directa de la interacción entre AQP4 y Cx43 se ha obtenido en astrocitos de ratón donde se ha disminuido la expresión de AQP4 por medio de RNA de interferencia. Ello induce una disminución de la expresión de Cx43 así como de la capacidad de acoplamiento célula-célula (Nicchia et al., 2005).

b) Absorción de potasio. La absorción de potasio por las células gliales es mediada por la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , y por el co-transportador  $Na^+/K^+/2Cl^-$  (NKCC). La absorción de  $K^+$  genera un desbalance en las cargas que tiene que

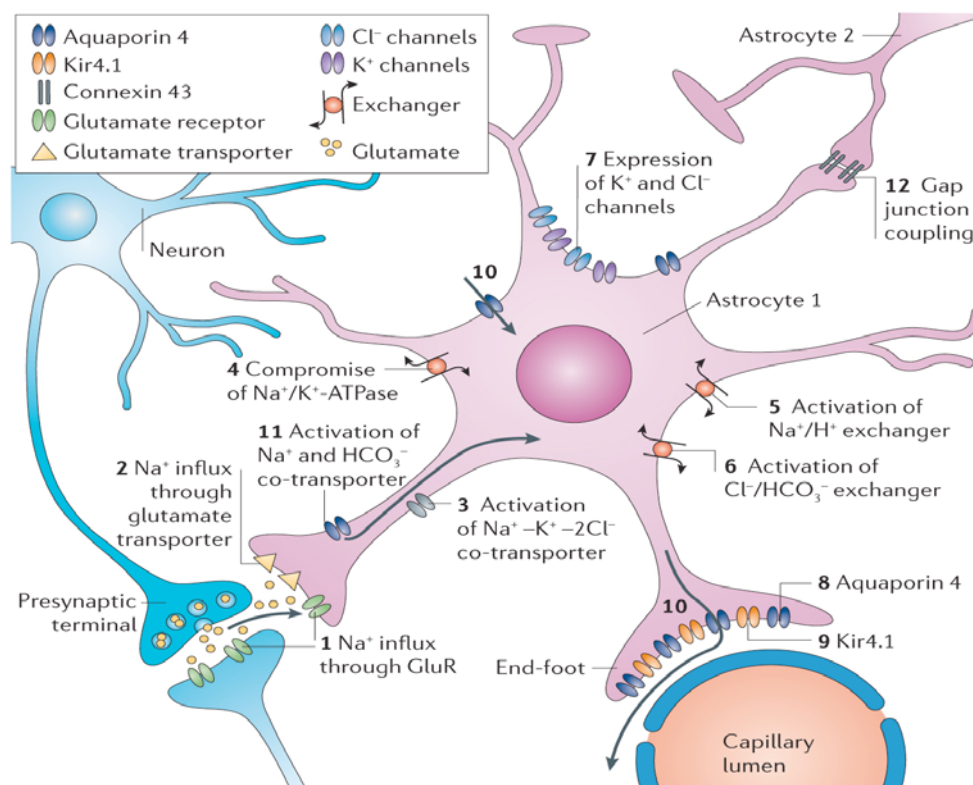


ser contrarrestada, y esto ocurre principalmente por la entrada paralela de  $\text{Cl}^-$ . Hay dos posibles vías para la entrada de  $\text{Cl}^-$ : a través de canales específicos de  $\text{Cl}^-$  (Coles et al., 1989), y recaptándolo conjuntamente con el  $\text{K}^+$  mediante el co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC) (Amedee et al., 1997). La reabsorción de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  da lugar a un incremento en la concentración intracelular de osmolitos, lo cual trae consigo reabsorción de agua. Esto da lugar a un aumento del volumen celular debido y a una contracción del espacio extracelular (Ballanyi et al., 1990). Otra manera de compensar la carga debida a la absorción de  $\text{K}^+$  sería el intercambio de  $\text{Na}^+$  en lugar de la entrada de  $\text{K}^+$ , a través de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Acoplado con el exporte de  $\text{Na}^+$  vía la ATPasa, la actividad de NKCC resulta en una ganancia neta de KCl, el cual es osmóticamente activo. Entonces, la tamponación del potasio extracelular vía NKCC da lugar a un hinchamiento celular astrocitario. Por tanto, la homeostasis intracelular de  $\text{Cl}^-$  es crítica para la regulación del volumen en los astrocitos.

Existen también evidencias de otros canales de  $\text{K}^+$  que puedan estar contribuyendo al tamponamiento del  $\text{K}^+$  extracelular. Es el caso de los canales TREK y TWIK pertenecientes a la familia de canales de  $\text{K}^+$  con 4 segmentos transmembrana y 2 poros (Seifert et al., 2009), los cuales están abiertos en un amplio rango de potencial de membrana, contribuyendo a una elevada conductancia de  $\text{K}^+$  por parte de los astrocitos, pudiendo estar por tanto involucrados en la reabsorción de  $\text{K}^+$ . También se ha comprobado el papel en la homeostasis de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular de las corrientes *outward* de  $\text{K}^+$  mediadas por el canal dependiente de voltaje Kv1.5 y por los canales de  $\text{K}^+$  activados por calcio (rSlo) (Benfenati and Ferroni, 2010). Además, se ha visto que los canales rSlo y el Kv1.5 co-localizan con AQP4 en el *endfeet*

astroglial que envuelve a la microvasculatura. También se ha visto recientemente que los pies astrocitarios contienen los subtipos TREK y TWIK (Seifert et al., 2009), sugiriendo un posible papel de estos canales en el tamponamiento del  $K^+$  extracelular.

Todos los mecanismos de tamponamiento del potasio extracelular (por difusión, por tamponamiento espacial y/o por la entrada de  $K^+$  en asociación con el  $Cl^-$  a través de canales de  $Cl^-$  o del transportador NKCC) tienen la ventaja de que no requieren un gasto energético para las células gliales, y que son mecanismos reversos cuando la concentración extracelular de  $K^+$  es reducida debido a la reabsorción neuronal. La tamponación espacial es el mecanismo principal durante la actividad fisiológica normal. En cambio, bajo condiciones patológicas, como isquemia o un ataque epiléptico, la reabsorción del  $K^+$  es el mecanismo que tiene una mayor contribución. Sin embargo, la absorción de  $K^+$  junto con  $Cl^-$  tiene la contrapartida de causar hinchamiento celular, pudiendo dar lugar a edema. Entonces es importante la actividad de la bomba ATPasa de  $Na^+/K^+$ .



**Figura 22: Implicación de los astrocitos en la regulación del tamponamiento extracelular de K<sup>+</sup> durante la actividad sináptica y en la regulación del volumen celular.** El aumento de los niveles de glutamato produce hinchamiento neuronal y cambios en la morfología de la glía y el espacio extracelular. El hinchamiento neuronal parece resultar de un influjo de Na<sup>+</sup> a través de los receptores AMPA y Kainato (1) y a través de la entrada de Cl<sup>-</sup> y agua. El hinchamiento glial después de la exposición a glutamato resulta de la entrada de Na<sup>+</sup>, el cual entra por los transportadores de glutamato (2). Altas concentraciones de potasio en el medio extracelular puede causar hinchamiento a través de los co-transportadores NKCC (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>) (3). El hinchamiento astrogial involucra muchos mecanismos como la activación de la bomba ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (4), los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (5) y Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (6), y el co-transportador NKCC (3). También se activan varios canales de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en los astrocitos hinchados (7). AQP4 (8) se expresa exclusivamente en los astrocitos, especialmente en los pies astrocitarios rodeando los capilares sanguíneos, y regulando el volumen astrocitario, el intercambio vascular, el tamaño, la forma y las características de difusión del espacio extracelular. La co-localización de AQP4 y Kir4.1 (9) indica que ambas moléculas son imprescindibles para llevar a cabo el tamponamiento espacial de K<sup>+</sup>. Además, el incremento de la concentración extracelular de K<sup>+</sup> causa despolarización en los astrocitos adyacentes, lo que favorece la reabsorción de Na<sup>+</sup> y bicarbonato a través de los co-transportadores Na<sup>+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (11). El aumento en la osmolaridad intracelular da lugar a un flujo de agua a través de AQP4. El tamponamiento espacial de iones y agua es también dependiente del acoplamiento en red astrocitario a través de las uniones *gap*. Adaptado de (Seifert et al., 2006).

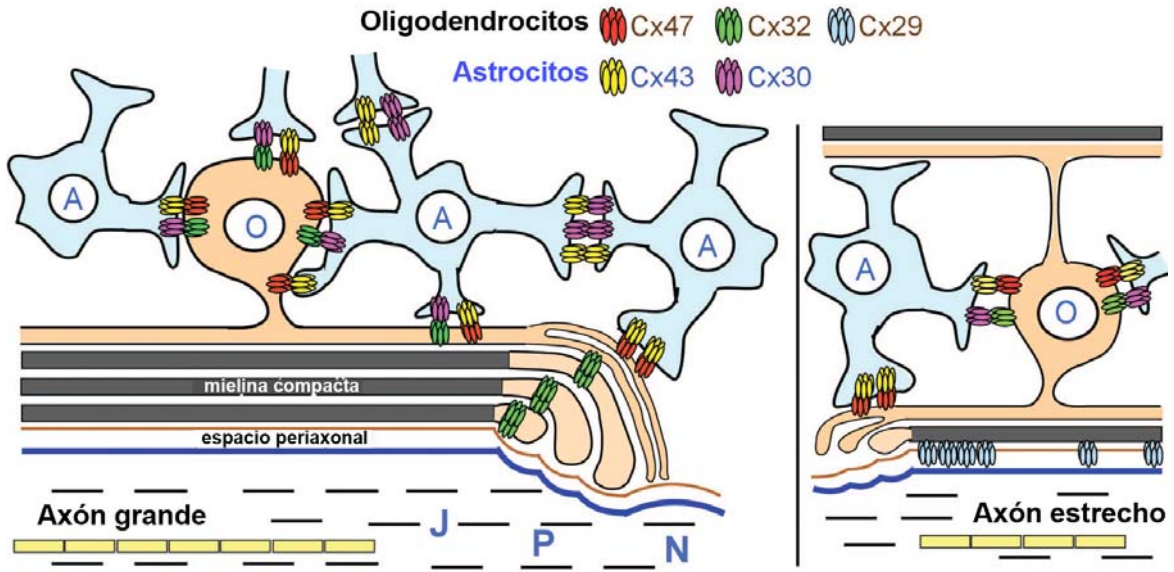
### 5.3 IMPORTANCIA DE LAS REDES GLIALES ENTRE ASTROCITOS Y OLIGODENDROCITOS.

Las funciones astrocitarias también tienen gran importancia en relación con los procesos de mielinización. Se han observado astrocitos y oligodendrocitos intercalados, formando redes que se extienden a lo largo de la fibra nerviosa (Reynolds and Wilkin, 1991). La presencia de uniones entre las diferentes células gliales constituye una unidad tanto funcional como anatómica (Suzuki and Raisman, 1994). Además de las clásicas redes astrocitarias constituidas por uniones de tipo *gap* (Fischer and Kettenmann, 1985), (Nedergaard et al., 2003), también existe este tipo de uniones entre oligodendrocitos (Butt and Ransom, 1989). Asimismo existen redes generadas a partir de uniones mixtas de astrocitos y oligodendrocitos (Giaume and Venance, 1995), dando lugar a un sincitio general común entre dichas células gliales, que se extiende radialmente desde el canal espinal y los ventrículos cerebrales, hasta la glía envolvente y el epitelio vascular, pasando por regiones

de las sustancias gris y blanca (Rash et al., 1997), (Rash, 2010).

En los oligodendrocitos destacan las conexinas (Cx) 32, 47 y 29. Forman uniones *gap* entre oligodendrocitos, entre las capas de mielina, y también entre astrocitos. La Cx32 se expresa mayoritariamente en las fibras mielinizadas de la sustancia blanca, en los paranodos que bordean los nódulos de Ranvier, formando uniones *gap* dentro de la vaina de mielina. La Cx47 forma principalmente uniones *gap* con astrocitos. Normalmente su pareja astrocitaria es la Cx43. La Cx29 suele formar hemicanales dentro de la mielina de pequeñas fibras en algunos tractos de la sustancia blanca de la médula espinal (Sargiannidou et al., 2010), (Abrams and Scherer, 2011) (Figura 21). Los astrocitos expresan tres tipos de conexinas: la Cx43, la Cx30 y la Cx26 (Nagy et al., 2004), siendo la Cx43 la más frecuente (Giaume and Venance, 1995). Las uniones *gap* entre astrocitos suelen ser homoméricas, compuestas por Cx43/Cx43 o Cx30/Cx30. Sin embargo, las uniones entre astrocito y oligodendrocito suele ser heteromérica, entre Cx32/Cx30 o Cx47/Cx43 (Sargiannidou et al., 2010), (Abrams and Scherer, 2011).

La formación de esta red glial entre astrocitos y oligodendrocitos es importante para la formación de la mielina. Por ejemplo, mutaciones que afectan al gen que codifica para la Cx43 astrocitaria dan lugar a la displasia oculodentodigital, donde los pacientes muestran una desmielinización (Sargiannidou et al., 2010), (Abrams and Scherer, 2011). Asimismo, el acoplamiento por uniones *gap* entre astrocitos y oligodendrocitos son importantes también para formar la red glial necesaria para el tamponamiento del  $K^+$  extracelular durante la actividad neuronal en las proximidades de los axones mielinizados (Rash, 2010).



**Figura 23: Dibujo esquemático donde se representa la conectividad entre astrocitos (A) y oligodendrocitos (O) a través de las uniones gap.** Se muestra la localización de las Cx 29, Cx32, Cx47 oligodendrogiales, y de las Cx43 y Cx30 astrocitarias. La pareja de la Cx47 oligodendrocítica es la Cx43 astrocitaria, mientras que la Cx32 forma canales heterotípicos con la Cx30 astrocítica. Adaptado de (Sargiannidou et al., 2010).

# **OBJETIVOS**

*Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.*

*Julius Robert Oppenheimer*



La Leucoencefalopatía Megalencefálica con quistes subcorticales (MLC) es una enfermedad genética de la cual no se conoce el mecanismo patológico; por esta razón no existe un tratamiento específico para los pacientes. Es por ello que el objetivo general de esta Tesis es avanzar en la comprensión del posible mecanismo de acción de la proteína MLC1 y así ahondar en el conocimiento de la patofisiología de la enfermedad.

Con este fin se han propuesto los siguientes objetivos:

**1) Estudio de las vías de degradación de la proteína MLC1 y de varias variantes que portan diferentes mutaciones presentes en pacientes con MLC.**

El abordar el estudio de las posibles vías de degradación de las proteínas portadoras de mutaciones en *MLC1* podría ayudarnos a esclarecer si el tránsito intracelular de estas variantes resulta alterado, pudiendo obtener una explicación del mecanismo molecular del efecto de las mutaciones en *MLC1* presentes en los pacientes.

**2) Identificación y análisis del interactoma de MLC1.**

El desconocimiento de la función que desempeña MLC1 hace difícil entender el mecanismo patofisiológico de la enfermedad. Por eso, en este objetivo se ha pretendido identificar al conjunto de proteínas que interaccionan con MLC1 para de esta manera intentar encontrar información acerca de la función que MLC1 pudiera estar llevando a cabo. Asimismo, el hecho de que existiera un 25% de pacientes que no tenían mutaciones en *MLC1* sugería que debía al menos existir otro gen implicado en la enfermedad. Es por ello que la



estrategia de identificación y análisis del interactoma podría darnos la posibilidad de encontrar el segundo gen responsable de la enfermedad.

### **3) Estudios iniciales para la obtención de modelos animales de la enfermedad MLC en el pez cebra.**

Las numerosas ventajas que ofrece el pez cebra para ser utilizado como modelo animal de enfermedad hizo que nuestro grupo lo eligiera para ahondar en la patofisiología de la enfermedad MLC, ya que en este modelo se pueden realizar un conjunto de técnicas que resultan imposible de efectuar en un modelo de ratón. En este objetivo se generarán herramientas para el comienzo de la creación de un modelo de MLC en el pez.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

*Más que escasez de medios, hay miseria de voluntad. El entusiasmo y la perseverancia hacen milagros.*

*Santiago Ramon y Cajal*



## **1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Hoy en día no podemos entender la biología molecular sin el uso de los plásmidos. Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer al menos tres características: 1) Debe tener su propio origen de replicación y por tanto la capacidad de replicación autónoma independiente del genoma del hospedador. 2) Debe tener sitios de clonación múltiple que permitan la apertura del DNA con enzimas de restricción y hacer posible la clonación de insertos de DNA en la forma y orientación determinada. 3) Debe poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar las células hospedadoras que contengan el vector. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una primera tarea de la ingeniería genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales.

### **1.1 OBTENCIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DEL DNA.**

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de DNA para sus diferentes utilidades, éste debe sufrir un proceso de amplificación. Para ello, se parte de un DNA plasmídico purificado, que contiene el inserto de interés y un gen de selección de resistencia a un antibiótico. Al tratarse de un DNA con capacidad autorreplicativa en células bacterianas, se procede a sensibilizar a éstas, sometiéndolas a un choque térmico o eléctrico, y a introducirles dicho DNA recombinante. Dicho proceso se denomina *transformación*. Una vez se han transformado las bacterias, se hacen crecer en placas de LB-agar que

contienen el antibiótico al que sólo presentan resistencia las bacterias que han incorporado el DNA plasmídico exógeno. El DNA plasmídico amplificado es extraído de las bacterias utilizando equipos comerciales (*Maxi-Preps* y *Minipreps* (Qiagen)). Posteriormente, el DNA es cuantificado, y analizado por restricción y secuenciación, con el fin de comprobar la calidad e identidad del DNA amplificado. Las bacterias que han sido utilizadas habitualmente durante la realización de esta Tesis son las cepas DH5 $\alpha$  y DB3.1, de *Escherichia coli*.

### **1.1.1 Método de obtención de bacterias electrocompetentes de alta eficiencia.**

La electroporación es un método en el que cepas de *E.coli* son transformadas a unas eficiencias del orden de  $10^9$  o  $10^{10}$  transformantes/ $\mu$ g.

#### REACTIVOS

- Bacterias *E coli* de la cepa DH5 $\alpha$ .
- Medio LB o SOC.
- Glicerol al 10% (v/v) en agua, autoclavado o esterilizado por filtración. Debe utilizarse a 4°C.
- Tubos de centrifuga de 500 ml autoclavados. Deben usarse a 4°C.

#### METODOLOGÍA

El protocolo se realiza bajo campana de flujo laminar o bajo la acción de una llama o mechero *bunsen*.

1. Se raspa de un glicerol de bacterias DH5 $\alpha$  y se inoculan en 5 ml de LB sin antibiótico de selección. Se incuban a 37°C en agitación, durante toda la noche (12-16 horas).
2. Al día siguiente, se diluye el precultivo 1:100 (v/v) en 500 ml de medio LB

fresco, y se incuba a 37°C, en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5 - 0,7, momento en que las bacterias se encuentran en su fase logarítmica de crecimiento.

3. Se para el crecimiento bacteriano incubando las bacterias en hielo durante 20 minutos. (A partir de este paso, todos los procesos deben realizarse a una temperatura entre 0 y 4°C).

4. Se transfieren las bacterias a tubos de centrífuga de 500 ml de capacidad (previamente esterilizados y enfriados) y se centrifugan a 4000 g durante 15 minutos a 4°C.

5. Se elimina el sobrenadante por decantación, con precaución. Es muy importante eliminar todo el sobrenadante, incluso aunque se pierda una pequeña parte de las de las bacterias.

6. Se resuspende el *pellet* en 500 ml de glicerol 10% en agua (previamente esterilizado y enfriado), y se centrifuga el homogenado a 4000 g durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se decanta el sobrenadante.

7. Se repite el proceso efectuado en el paso 5 y 6 dos veces, salvo que esta vez con 250 ml.

8. Después de decantar el sobrenadante, se resuspende el *pellet* con 2 ml de glicerol 10% en agua.

9. Finalmente, se efectúan alícuotas de 50 µl, que son congeladas en nitrógeno líquido rápidamente. Las alícuotas son guardadas a -80°C.

### **1.1.2 Transformación de bacterias.**

#### **a) MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN.**

La electroporación es una técnica de transformación de bacterias que consiste en aplicarles un choque eléctrico para permeabilizar la pared celular

bacteriana produciendo poros a través de ella, los cuales permitirán la entrada de DNA exógeno. El DNA que se quiere transformar mediante electroporación debe estar libre de sales, ya que interfiere en la eficiencia del proceso.

Se añaden 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  del DNA a transformar en una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de las bacterias electrocompetentes, manteniéndolo siempre en hielo. Tras homogenizar bien la mezcla, ésta se introduce entre los dos electrodos de una cubeta de electroporación de 0,1 cm (*BioRad*) enfriada previamente. A continuación, se le aplica una descarga eléctrica de 375 V mediante un electroporador (*BioRad micropulser*) usando el programa "Ec1". Al aplicar la corriente, el electroporador ofrece un dato de "*time constant*", en milisegundos, que ofrece una idea del tiempo que la muestra ha estado sometida al choque eléctrico. Cuanto mayor sea el tiempo empleado, mayor cantidad de poros se habrán producido, aumentándose la posibilidad de entrada del DNA exógeno en la bacteria. Esto se traduce en una mayor eficiencia de transformación. Tras electroporar, se rescata la muestra añadiendo 250  $\mu\text{l}$  de medio LB o SOC sin antibiótico y se pasa a un nuevo tubo, el cual se incuba a 37°C en agitación durante 60 minutos. Esta incubación de 60 minutos se efectúa con el fin de que se exprese el gen de resistencia al antibiótico de selección contenido en el plásmido. Tras la incubación, se siembran unos 200  $\mu\text{l}$  de bacterias transformadas en una placa de Petri que contiene medio LB-agar con el antibiótico de selección. Tras dejar secar las placas durante unos minutos a temperatura ambiente, con el fin de que todo el líquido se absorba, se dejan en posición invertida a 37°C, durante 12-16 horas. El resto del volumen del cultivo no plaqueado, se guarda a 4°C durante un máximo de 3 o 4 días.

Paralelamente, se efectúa un control negativo de transformación, en el que se siembran bacterias sin transformar con DNA exógeno.

Al día siguiente, no debe haber crecimiento de colonias en las placas con el control negativo de transformación. En aquellas donde sí se transformó DNA exógeno y existe crecimiento, se pican diversas colonias y se realizan pre-cultivos en 3-5 ml de LB con el antibiótico de selección. Se incuban a 37°C en agitación durante toda la noche con el fin de efectuar una extracción del DNA y analizar aquellas que hayan incorporado el plásmido.

#### b) MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO (HEAT SHOCK).

Por cada 100 µl de células competentes, se inoculan entre 50 y 100 ng de plásmido recombinante. La mezcla se realiza en tubos de polipropileno estériles de 15 ml, o bien en tubos *ependorf* estériles, agitando manualmente y suavemente. Dicha mezcla se incuba durante 30 minutos en hielo. Seguidamente se efectúa el *choque térmico*, que consiste en incubar las bacterias que han permanecido en hielo, a 42°C, durante 45 segundos. A continuación, se transfieren inmediatamente al hielo. Tras una incubación de 2 minutos en hielo, se añaden a la mezcla 900 µl de medio LB sin antibiótico de selección (o medio SOC) y se incuba a 37°C en agitación, durante 60 minutos. El proceso de plaqueado, recogida y procesado de colonias, se efectúa de la misma manera que en el caso anterior.

### **1.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.**

Estos procesos consisten en extraer el DNA amplificado obtenido a partir del proceso de transformación. Para ello se han utilizado los equipos comerciales de *Quiagen (Quiagen Plasmid kit)*, siguiendo los protocolos del fabricante. Dependiendo del volumen del cultivo, se pueden obtener pequeñas



cantidades de DNA plasmídico en el caso de las minipreparaciones (0,3 - 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), o grandes cantidades de DNA en el caso de las maxipreparaciones (1 - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Ambos procesos se basan en el mismo principio de aislamiento: lisis alcalina de las bacterias con una posterior unión del DNA a una resina de intercambio iónico. Además, se deben eliminar del DNA las impurezas (lípidos, proteínas, RNA, DNA cromosómico, etc.). Esto se consigue mediante una serie de lavados de la resina con una solución de salinidad mediana que contiene etanol. Finalmente, el DNA purificado se eluye con agua o con un tampón de mayor salinidad.

### **1.2.1 Minipreparaciones.**

El proceso se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones del equipo comercial *Qiagen Plasmid Mini Kit (Quiagen)*.

#### MATERIALES

- Se parte de un precultivo de 3-5 ml (12-16 horas a 37°C), que contiene antibiótico de selección.

#### REACTIVOS

- Solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNAsa A).
- Solución de lisis (200 mM NaOH, SDS 1%).
- Solución de neutralización (2.55 M acetato potásico, pH 4,8).
- Columnas de intercambio iónico (*Qiagen*).
- Solución de lavado (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA. (Esta solución se mezcla 1:1 con etanol absoluto).
- Agua o tampón de elución (TE) de salinidad alta.

## METODOLOGÍA

1. Se centrifugan los 3-5 ml de precultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se decanta el sobrenadante.
2. El *pellet* se resuspende con 250  $\mu$ l de tampón de resuspensión, que contiene RNAsa, y que se mantiene a 4°C.
3. Al homogenado, se le añaden 250  $\mu$ l de tampón de lisis y se mezcla por inversión, hasta que la solución se vuelve azulada. A continuación, se añaden 350  $\mu$ l de tampón de neutralización, y se homogeniza por inversión hasta que la solución adquiere una consistencia densa de un color blanco opaco.
4. Se centrifuga el homogenado a 13000 rpm, durante 10 minutos en una centrifuga de mesa, a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante se transfiere posteriormente a un tubo acoplado a una columna que contiene la resina de intercambio iónico (*Qiagen*), y se mantiene en contacto con ella durante 1 minuto, con el fin de obtener una mayor recuperación de DNA.
6. La columna se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm, de forma que el sobrenadante queda depositado por gravedad en el fondo del tubo, y el DNA queda acoplado a la resina. Se desmonta la columna del tubo y se elimina el sobrenadante.
7. Se vuelve a acoplar la columna al tubo, y se añaden 750  $\mu$ l de solución de lavado (con etanol), y se repite el proceso anterior. Posteriormente, se efectúa una nueva centrifugación sin añadir ningún tampón, con el fin de eliminar de la columna restos de etanol, que degradarían el DNA.
8. Finalmente se procede a eluir el DNA, trasladando la columna a un tubo *ependorf* nuevo. Se añaden 50  $\mu$ l de un tampón de elución de salinidad alta

(tampón TE) o bien 50 µl de agua MiliQ y se deja reposar durante 1 minuto. Finalmente, se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, quedando depositado el DNA en el fondo del nuevo *ependorf*. En la mayoría de los casos, la elución se ha llevado a cabo con agua MiliQ, que ofrece una gran eficiencia de elución igualmente y el DNA no queda en una solución con sales que puedan ser un inconveniente en futuros procesos.

9. El DNA extraído se cuantifica (ver apartado 1.2.4), y se guarda a -20°C.

### **1.2.2 Maxipreparaciones.**

El objetivo es el de extraer grandes cantidades del DNA transformado. Tras ser eluido, el DNA se concentra precipitándolo con isopropanol. El proceso se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones del *kit* comercial *Qiagen Plasmid Maxi Kit*.

#### MATERIALES

- Un precultivo de 3-5 ml, que sirve de *starter*, será utilizado para efectuar un salto de escala, incubándolo en 500 ml de cultivo líquido LB-antibiótico de selección, a 37°C en agitación durante 12-26 horas.

#### REACTIVOS

- P1: Tampón de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml de RNasa A, que se mantiene a 4°C).
- P2: Tampón de lisis (200 mM de NaOH, SDS 1%).
- P3: Tampón de neutralización (3M acetato potásico, pH 5.5).
- QBT: Tampón de equilibrado (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% etanol; 0.15% Tritón X-100).
- QC: Tampón de lavado (1M NaC; 150 mM MOPS, pH 7.0; 15% etanol).

- QF: Tampón de elución (1.25M de NaCl; 50 mM de Tris-HCl, pH 8.5; 15% de etanol).
- Isopropanol.
- Etanol al 70%.
- Tubos de centrifuga de 500 ml autoclavados.
- Agua o tampón de elución (TE) de salinidad alta.

### METODOLOGÍA

1. Se centrifuga el cultivo de 500 ml a 6000 g, a 4°C durante 15 minutos, y se elimina el sobrenadante.
2. El *pellet* se resuspende, con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, en 10 ml de tampón de resuspensión (P1), que contiene RNAsa, y se mantiene a 4°C.
3. A continuación se añaden 10 ml de tampón de lisis (P2), se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Es importante que el tiempo de incubación no sea mayor de 5 minutos.
4. Seguidamente se añaden 10 ml de tampón de neutralización (P3) y se mezcla por inversión (de 4 a 6 veces) hasta que la consistencia se vuelve densa y de un color blanco opaco.
5. Transferimos el lisado a unas columnas especiales (*Quiafilter Cartridges, Quiagen*) y lo incubamos durante 10 minutos a temperatura ambiente (sin insertar el émbolo).
6. Mientras tanto, durante los 10 minutos de incubación, se equilibra la columna que contiene la resina de intercambio iónico (*Quiagen-tipo 500*), efectuando 2 lavados con 10 ml de tampón QBT cada uno, dejando que pase por la columna por gravitación.
6. Tras equilibrar la columna y después de los 10 minutos de incubación del

lisado, se quita la tapa de la columna *Quiafilter Cartridge* y se inserta el émbolo (sin apretar con extremada fuerza). El líquido filtrado se hace pasar por la columna *Qiagen*-tipo 500 previamente equilibrada, de forma que el sobrenadante se deja caer por gravedad y el DNA permanece retenido en la resina.

7. Se efectúan 2 lavados de la columna con 30 ml de tampón QC.
8. La elución del DNA se lleva a cabo adicionando 15 ml de tampón QF, y recogiendo el sobrenadante en un tubo de 30 ml especial para ser centrifugado a altas velocidades.
9. El volumen recogido se precipita con 0,7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifuga a una velocidad  $\geq 15000$  g durante 30 minutos a 4°C.
10. Tras eliminar el sobrenadante cuidadosamente, el *pellet* se lava con 5 ml de etanol al 70% (sin resuspender) y se centrifuga nuevamente a una velocidad de  $\geq 15000$  g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se elimina el sobrenadante y se deja secar el *pellet* a temperatura ambiente entre 5-10 minutos.
11. Finalmente, el *pellet* (DNA plasmídico) se resuspende con un volumen entre 100 y 200  $\mu$ l (dependiendo del tamaño del *pellet*) de tampón TE o agua y se transfiere a un tubo *ependorf* nuevo.
12. Por último, el DNA es cuantificado (ver apartado 1.2.4) y guardado a -20°C.

### **1.2.3 Precipitación del DNA.**

El proceso de precipitación del DNA se lleva a cabo tanto para purificar el DNA así como para concentrarlo. A la muestra de DNA se añade 3 veces su volumen etanol al 95% o isopropanol (también se puede añadir acetato de

sodio 3M a 1/10). Se incuba durante 30 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$  para favorecer la precipitación. Después de este paso, se centrifuga a 13300 rpm 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se procede a decantar el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el *pellet* y se efectúan 2-3 lavados con etanol al 70%, centrifugando durante 5 minutos a 13300 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se decanta el sobrenadante tras el último lavado y se deja secar el *pellet*. El DNA se resuspende con agua Mili-Q y es conveniente dejarlo a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de cuantificarlo. Posteriormente, puede ser guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2.4 Cuantificación del DNA.

Los ácidos nucleicos tienen un pico de absorbancia a una densidad óptica de 260 nm, hecho que permite su cuantificación y validación del grado de pureza. El DNA extraído (o RNA), se cuantifica en un espectrofotómetro, a una DO de 260 nm, realizando un perfil de la absorbancia de 220-320 nm. El DNA purificado presenta una curva típica con su máximo a 260 nm, punto que se mide para extrapolar la concentración de la muestra.

La muestra de DNA (1-2  $\mu\text{l}$ ) se pasa por el espectrofotómetro (*Nano-Drop*), que te da la absorbancia a 260 nm, la cual corresponden a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA (o 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNA) y la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La fórmula a aplicar es la siguiente:

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

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

(donde C es la concentración, ABS la absorbancia y FD, el factor de dilución).

Es conveniente utilizar una muestra “blanco”, que contenga solamente agua MiliQ, como calibración previa de la medida.

### 1.2.5 Secuenciación

El último paso para comprobar la construcción obtenida es asegurarse que su secuencia de nucleótidos es la correcta. Para ello se procede a secuenciar dicha construcción. Existen diversos sistemas comerciales basados en el método de Sanger (Sanger et al., 1977). El que se ha utilizado en la presente Tesis es el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* y el analizador de ABI3730 de la casa comercial *Applied Biosystems*.

#### MATERIALES

- Termociclador (Applied Biosystems).
- Secuenciador ABI3730.

#### REACTIVOS

- *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.
- Tampón de secuenciación 5x (*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*).
- Construcción conteniendo el gen de interés.
- *Primer* correspondiente a 1  $\mu$ M. Consiste en una secuencia de oligonucleótidos que se encuentra a cierta distancia a 5' o 3' del gen que se desea secuenciar. Es recomendable efectuar varias reacciones de secuencia para un mismo gen, de manera que se obtengan un mínimo total de dos secuencias para cada región del gen.

#### METODOLOGÍA

1. En un tubo de PCR se mezclan 0,5 - 1  $\mu$ g de DNA, 1  $\mu$ l de *BigDye*, 1  $\mu$ l de tampón de secuenciación, 3,2  $\mu$ l de *primer* y agua MiliQ hasta un volumen final de 10  $\mu$ l. El *BigDye* es el último reactivo que se añade.
2. La reacción de PCR se efectúa en las siguientes condiciones: 25 ciclos de

desnaturalización a 96°C, 10 segundos; hibridación a 50°C, 5 segundos; elongación a 60°C, 4 minutos; finalmente se terminaba la reacción a 4°C.

3. Finalizada la reacción de PCR, se añaden 10 µl de agua Mili-Q y se envía a secuenciar a los Servicios Científico-Técnicos del Parque Científico de Barcelona.

### **1.3 CLONAJE DE DNA PLASMÍDICO.**

Las diferentes técnicas de biología molecular actuales permiten la manipulación y la modificación de fragmentos de DNA con relativa facilidad. Hoy en día es relativamente fácil y rápido diseñar y construir vectores específicos para una aplicación o un ensayo experimental concreto.

Durante el presente trabajo se han desarrollado diferentes técnicas de clonaje para insertar los genes de interés en un plásmido o vector: por digestión-ligación o clonación clásica mediante el uso de enzimas de restricción, clonación por recombinación mediante el sistema *Gateway* (*Invitrogen*) y clonación de mutantes mediante PCR.

#### **1.3.1 Clonación clásica mediante el uso de enzimas de restricción.**

Este método permite insertar un gen de interés (inserto) en un vector de expresión determinado. Esto se consigue mediante la digestión tanto del vector como del inserto de modo que sus extremos sean compatibles y posteriormente puedan ser ligados o fusionados.

##### **1.3.1.1 Digestión con enzimas de restricción.**

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se utilizan para el clonaje de fragmentos. Dicho clonaje se basa en la característica que tienen



estas endonucleasas de cortar el DNA en dianas específicas, generando extremos cohesivos o romos.

La digestión del DNA con enzimas de restricción se efectuó de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial que suministran las enzimas (*New England Biolabs*). Se ha tenido en cuenta que el volumen de enzima utilizado no superase el 10% del volumen final, ya que una concentración final superior al 5% podría inhibir la actividad enzimática. La cantidad de enzima utilizada ha sido de 1-10 U/ $\mu$ g de DNA. Las digestiones se efectuaron, generalmente, a una temperatura de 37°C (excepto para los enzimas cuyas indicaciones fuesen otras), durante 1-16 horas, dependiendo de la eficiencia de la reacción y de la cantidad de DNA que se pretendía digerir. Así, en caso de efectuar por ejemplo una digestión para una clonación, la cantidad de DNA digerido habitualmente era de 10  $\mu$ g, tanto de vector como de inserto, con lo que el tiempo de digestión era mayor (toda la noche) que el necesario para elaborar un test de integridad de una mini o una maxipreparación, para los que sólo era necesario digerir una pequeña cantidad de DNA (1  $\mu$ g) y durante menos tiempo (1-6 horas). En el caso de tratarse de reacciones dobles, si el tampón de digestión es común a los dos enzimas, la incubación del DNA con estos enzimas es simultánea. Sin embargo, si uno de estos enzimas fuese incompatible con las condiciones de reacción del otro, la digestión se efectúa en dos pasos: el DNA es digerido con una de las enzimas con su tampón de digestión correspondiente y a continuación, todo el producto de la digestión es procesado por electroforesis en un gel de agarosa. La banda de DNA obtenida es purificada y disuelta en agua MiliQ. Sobre este DNA linearizado y purificado, se efectúa la segunda digestión.

### **1.3.1.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Para visualizar los fragmentos generados a raíz de una digestión, se lleva a cabo la electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante, de forma que los fragmentos separados sean dúplex de DNA. Así, la migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular. Paralelamente a las muestras, se cargan marcadores de pesos moleculares.

#### **MATERIALES**

- Cubeta de electroforesis.
- Fuente de suministro de corriente eléctrica.

#### **REACTIVOS**

- TAE (Tampón Tris-acetato) 50X (2 M Tris-base, 1 M ácido acético, 50 mM EDTA). Se guarda a temperatura ambiente y se usa a 1X.
- Tampón de carga 5X (40 mM EDTA, 0,1% SDS, 30% Ficol 400, 0,2% azul de bromofenol). Se guarda alicuotado a -20°C, y se usa a 1X.
- Gel de agarosa. Se suele preparar la agarosa al 1-2% en TAE 1X y 1 µg/ml de bromuro de etidio. Alternativamente, es posible añadir el bromuro de etidio a las muestras, en lugar de al gel (1 µl por muestra), o bien teñir el gel tras la migración en una solución de TAE 1X o agua destilada que contenga 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.
- Marcador de pesos moleculares.

#### **METODOLOGÍA**

1. En el caso de muestras de las que se pretende simplemente testar su correcta digestión, se preparan de forma que haya 1-2 µg de DNA por muestra cargada y que el volumen final de la muestra (DNA, tampón de carga y agua destilada estéril), sea entre 10-12,5 µl.

2. El gel se prepara con agarosa al 1-2% en TAE 1X, y se hierve en el microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente. Seguidamente se deja atemperar y se añade el bromuro de etidio. Se mezcla y se vierte en la cubeta que ya contiene el peine colocado.
3. Una vez polimerizado el gel, se coloca en la cubeta de electroforesis, se cubre con tampón de electroforesis (TAE 1X), se extrae el peine y se cargan las muestras. Es conveniente tener en cuenta que la migración del DNA se produce desde el polo negativo al positivo, ya que el DNA tiene carga negativa debido a la presencia de grupos fosfatos. La migración suele efectuarse a un voltaje entre 60-110 voltios, controlando siempre el frente de migración.
4. Las bandas se visualizan en un transiluminador de luz U.V. y se hace una fotografía.

#### **1.3.1.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

A menudo se necesitan purificar PCRs o fragmentos de DNA digeridos de plásmidos para la realización de un clonaje. Para ello, es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa y a continuación, aislar la banda de interés para después purificarla. Para ello se debe cargar una elevada cantidad de DNA en el gel (normalmente se carga toda la digestión o toda la PCR), ya que una gran parte del DNA se pierde durante el proceso de purificación. Así, el volumen de carga es de 50-100  $\mu$ l, por lo que es conveniente unir dos pocillos del peine con cinta adhesiva o *parafilm*. Se deja migrar la muestra hasta que la banda que se desea purificar se encuentra bien separada de las demás. No es conveniente exponer las muestras al U.V. mucho tiempo, ya que se pueden producir mutaciones en el DNA. La banda se corta del gel con una hoja de bisturí y se guarda en un tubo *ependorf*, para ser purificada utilizando

el equipo comercial *High pure PCR product purification kit (Roche)*. Dicho equipo hace uso de un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del DNA de doble cadena (en un rango de 100 pb a 48 Kb) a una matriz de fibra de cristal. Una vez que el DNA es “capturado”, las proteínas y sales contaminantes son lavados y el DNA purificado es eluido (con tampón TE o agua MiliQ). También se puede purificar una digestión o PCR directamente usando dicho equipo comercial sin necesidad de hacerla correr en un gel.

### REACTIVOS

- Tampón de captura. Columnas acopladas a tubos de 2 ml.
- Tampón de lavado (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA). Lleva etanol.
- Agua MiliQ o tampón TE.

### METODOLOGÍA

1. Se añaden entre 400-500 µl de tampón de captura (en función del tamaño de la banda de agarosa recortada) y se incuba a 60°C durante 5-15 minutos, hasta que se disuelve completamente la agarosa.
2. Se transfiere la muestra a una columna acoplada a un tubo de 2 ml y se incuba durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Se centrifuga a 13000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se retira el sobrenadante.
4. Se añaden 500 µl de tampón de lavado y se centrifuga nuevamente a 13000 g durante 1 minuto.
5. Se efectúa otro lavado de la columna con 250 µl del mismo tampón y se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.
6. Tras eliminar el sobrenadante, se transfiere la columna a un tubo *ependorf*

nuevo de 1,5 ml y se eluye el DNA purificado con 50 µl de tampón de elución o agua MiliQ.

#### **1.3.1.4 Tratamiento con fosfatasa alcalina.**

El tratamiento con fosfatasa alcalina tiene como objetivo eliminar los grupos 5'- fosfato del vector de DNA. De esta manera el vector no se puede religar y así, reducimos el número de colonias por religación de vectores que no presentan el inserto en el proceso de ligación. El inserto posee sus grupos fosfato, con lo que a pesar de aplicarle la fosfatasa alcalina al vector, un solo fosfato (el del inserto) es suficiente para que la ligación de éste con el vector se lleve a cabo.

En nuestro caso fue utilizada la fosfatasa alcalina de la casa *Roche*. Sobre un volumen total de 50 µl de vector digerido (mezcla de vector digerido, enzimas de restricción y tampón de digestión) se añadieron 2 µl de fosfatasa alcalina, y se incubó la muestra durante 30 minutos a 37°C. Seguidamente, se llevó a cabo una electroforesis y se procedió a la purificación del vector digerido y defosforilado, de la misma manera que se muestra en el apartado anterior.

#### **1.3.1.5 Ligación y transformación.**

Una vez obtenido el inserto purificado, y el vector purificado y defosforilado, éstos deben fusionarse en un proceso denominado *ligación*. Este proceso está catalizado por el enzima T4-DNA ligasa, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5'- fosfato y el 3' hidroxilo en DNA de doble cadena. Esta reacción finalmente se transforma en bacterias competentes, efectuando diferentes controles:

- *Control negativo de ligación*: Consiste en la transformación del vector sin inserto.
- *Control positivo de transformación*: se transforma una baja cantidad de DNA, procedente de una construcción conocida que funciona bien.
- *Control negativo de transformación*: se plaquean las bacterias sin transformar.

Una reacción de ligación ha funcionado bien si se obtienen muchas más colonias en la ligación problema que en el control negativo de ligación, y siempre que no crezca ninguna colonia en el control negativo de transformación. El éxito de la ligación depende de distintos factores:

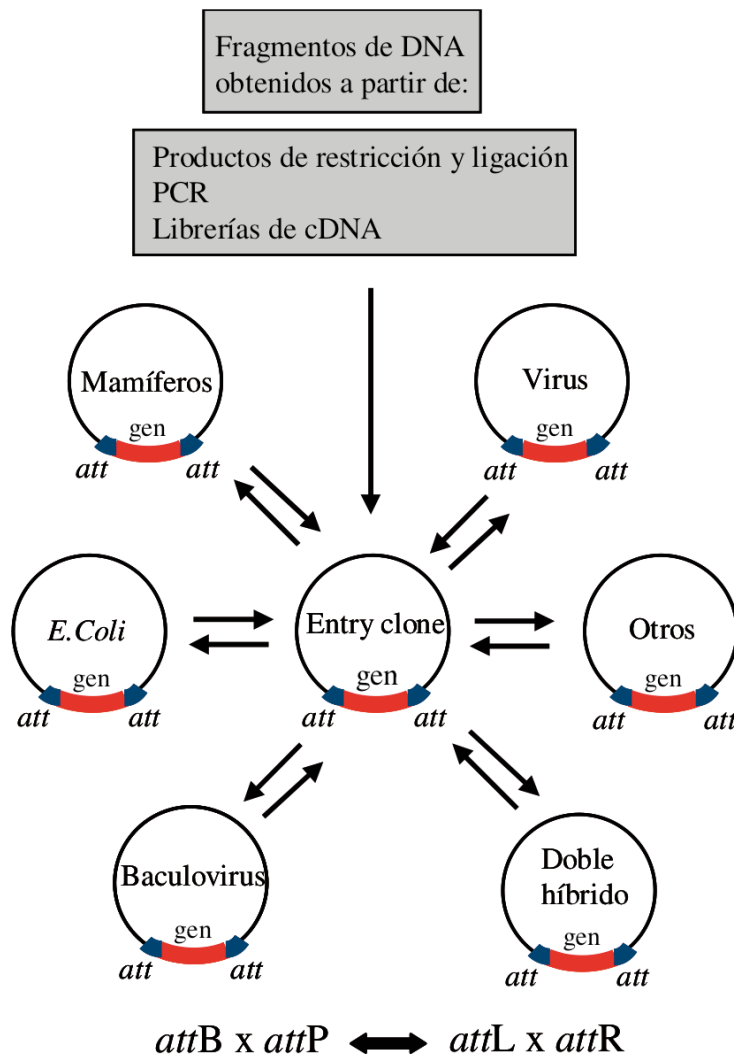
- 1) *La calidad y la cantidad del DNA utilizado en la reacción*: La calidad depende del tiempo en que haya estado expuesto a la luz U.V., la presencia o ausencia de restos de sales, agarosa, etc. En cuanto a la cantidad, la posibilidad de éxito será mayor, cuanto mayor sea la cantidad de vector e inserto que se haya obtenido en el proceso de purificación.
- 2) *Forma de los extremos*: Resulta más fácil ligar fragmentos cohesivos que fragmentos romos.
- 3) *Relación molar entre el vector y el inserto*: Siempre existe una relación óptima entre los dos fragmentos, que depende de cada caso.
- 4) *Grado de fosforilación del vector*: Es recomendable defosforilar el vector y aumentar el tiempo de reacción de la fosfatasa alcalina. Después debe purificarse el DNA, ya que la fosfatasa alcalina puede inhibir la reacción.
- 5) *Método de transformación*: Cuanto más eficiente es el método de transformación, mayor posibilidad hay de que las pocas moléculas que se han ligado produzcan colonias resistentes al antibiótico.

Generalmente, el proceso de ligación se efectúa en un volumen final de

10  $\mu$ l. En este caso, se han utilizado las siguientes proporciones: 6  $\mu$ l de inserto, 2  $\mu$ l de vector, 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*), y 1  $\mu$ l de tampón de la ligasa 10X. La reacción se incubó a 19°C durante toda la noche. Al día siguiente, la ligación es transformada en bacterias, el DNA es extraído de las bacterias, y es testado por digestión con enzimas de restricción y por secuenciación.

### **1.3.2 Clonación por recombinación mediante el sistema *Gateway* (*Invitrogen*).**

La tecnología *Gateway* (*Invitrogen*) consiste en un método de clonación basado en el sistema de recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Este sistema proporciona una manera más rápida y eficiente de transferir una secuencia de DNA a diferentes vectores comparado con el sistema clásico de clonaje mediante enzimas de restricción, debido a que evita los pasos de digestión, purificación y ligación, optimizando el tiempo de clonaje. El sistema permite la transferencia de un inserto de un vector a otro mediante la utilización de un vector de entrada (*Entry Clone*) capaz de recombinar con toda una gama de vectores destino, ya sean de expresión bacteriana, de mamíferos, lentivirales, adenovirales, etc, como se representa de forma esquemática en la figura 24.



**Figura 24: Flexibilidad del sistema de recombinación Gateway.** Sistema rápido y sencillo en el que un inserto de interés puede ser clonado por recombinación en cualquier vector de expresión a partir de una construcción intermedia (Entry clone). La transferencia del DNA (de una PCR, ligación, etc) a un vector, o de un vector a otro se hace por recombinación homologa gracias a las zonas recombinantes atts.

### 1.3.2.1 Clonaje con el sistema Gateway simple.

El sistema *Gateway* está basado en el ciclo biológico del fago *lambda* y en su sistema de recombinación en *E.coli*. En el fago  $\lambda$  la secuencia de recombinación es *attP* (243 pb), mientras que en *E.coli* es *attB* (25 pb). La reacción de integración consiste en la recombinación *attB* x *attP*, que está mediada por proteínas integrasa (Int) del fago  $\lambda$ , y el factor de integración huésped (*Host Integration Factor*, IHF) de *E.coli*. Como resultado de la reacción, se crean dos nuevos lugares de recombinación, *attL* y *attR*, flanqueando el profago recombinado, sin la pérdida de secuencia de DNA. La reacción puede llevarse a cabo en sentido opuesto, y se denomina reacción de



excisión. Cuando *attL* x *attR* recombinan (reacción mediada por la IHF y la excionasa (Xis)), el  $\lambda$ -DNA se escinde del genoma de *E. coli*, regenerando el sitio *attB* en *E. coli* y el *attP* en el fago. En resumen, la reacción es específica y bidireccional: ***attB* x *attP* ↔ *attL* x *attR***

Siguiendo el protocolo del proveedor (*Invitrogen*), el primer paso es diseñar los oligonucleótidos cebadores que permiten introducir las secuencias *attB1* y *attB2* en ambos extremos del fragmento de DNA de interés, mediante una reacción de PCR. Una vez se consigue flanquear el fragmento con las secuencias *atts* se lleva a cabo la reacción de recombinación entre el fragmento de PCR y un vector donador. Este vector donador (en nuestro caso, **pDONOR 221**) contiene las secuencias *attP1* y *attP2* y se utiliza para clonar el producto de PCR que contiene el gen de interés, flanqueado por *attB*, para generar los clones de entrada o *entry clones*. El pDONOR contiene el gen de resistencia a la kanamicina y el gen de selección negativa *ccdB*, el cual interfiere con la DNA girasa de *E. coli* (Bernard and Couturier, 1992), inhibiendo el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E. coli*.

Cuando ocurre el proceso de recombinación entre el fragmento de PCR y el vector donador (*attB* x *attP*), se obtiene un *entry clone* (**pENTR**-gen de interés), resistente a la kanamicina, en el que dicho gen de interés (flanqueado por secuencias *attL1* y *attL2*) elimina al gen *ccdB*.

Una vez obtenido el clon de entrada, podemos clonar nuestro inserto en cualquier vector destino (**pDEST**), que presenta resistencia a la ampicilina, contiene el gen *ccdB* y presenta las secuencias de recombinación *attR1* y *attR2*.

La recombinación entre el pENTR y el pDEST (*attL* x *attR*) resulta en

nuestro vector de expresión deseado, que contiene nuestro gen de interés flanqueado por las secuencias de recombinación *attB1* y *attB2*, y presenta resistencia a la ampicilina.

### 1.3.2.2 Reacción *attB* x *attP*. Construcción de *entry clones*.

El primer paso para construir un *entry clone* consiste en elaborar las secuencias *attB* que flanquearán el gen de interés. Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

*attB1*(forward): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACC(GEN)-3'  
*attB1*
*Kozak*

*attB2* (reverse): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TAG-(GEN)-3'  
*attB2*
*stop*

Las cuatro guaninas (G) añadidas al extremo 5' de cada oligonucleótido aumentan la eficiencia de la recombinasa. A continuación se introduce la secuencia *attB1*, y antes de añadir la secuencia del gen de interés añadimos la secuencia KOZAC (ACC) antes del codón de inicio del gen (ATG), lo cual facilita el reconocimiento de la secuencia de iniciación (AUG) durante el proceso de traducción en los eucariontes. Seguidamente se añaden unas 18-25 pb del gen de interés. En la secuencia *attB2* es importante no olvidarse de añadir la secuencia de parada de la traducción del gen de interés.

La reacción de recombinación entre el gen de interés flanqueado por *attBs* y el pDONOR (flanqueado por los *attPs*) se lleva a cabo mediante una enzima recombinasa, la **BP clonasa II**, obteniendo el clon de entrada (*attL1* y *attL2*). En un tubo eppendorf de 1,5 ml se añaden los siguientes reactivos (reacción optimizada):

Producto de PCR - <i>attB</i> (20-50 fmoles)	3 $\mu$ l
pDONOR (150ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
BP clonase	1 $\mu$ l

La reacción se incuba a 25°C entre 2-12 horas. La reacción se para añadiendo 0,5  $\mu$ l de solución de proteinasa K e incubándola a 37°C durante 10 minutos. Finalmente se transforma 0,5 - 1  $\mu$ l de la reacción en bacterias DH5 $\alpha$  por electroporación y se plaquean los transformantes en placas con LB-agar que contienen 50  $\mu$ g/ml de kanamicina. Una vez extraído el DNA y comprobado por digestión y secuenciación, se procede con el protocolo.

### 1.3.2.3 Reacción *attL* x *attR*. Construcción de vectores de expresión.

La recombinación entre un *entry clone*, que contiene secuencias *attL*, y un vector destino, con secuencias *attR*, se lleva a cabo utilizando un enzima LR clonasa II. La mezcla de reactivos consiste en:

Vector Destino	150 ng
<i>Entry clone</i>	150 ng
Agua MilliQ	hasta 5 $\mu$ l de volumen final
LR clonasa II	1 $\mu$ l

La mezcla se incuba entre 2 horas a toda la noche a 25°C y se para añadiendo 0,5  $\mu$ l de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C. La transformación se lleva a cabo de la misma manera que en el caso anterior, salvo que en este caso, la selección se realiza con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Los vectores resultantes son comprobados por digestión y posterior secuenciación.

### 1.3.2.4 Clonaje con el sistema *Gateway Multisite* de 2 fragmentos.

El sistema *Gateway* nos permite construir vectores de expresión de

manera rápida y eficiente a partir de 2, 3 o 4 fragmentos de DNA gracias al sistema *Multisite*. Esta tecnología utiliza la recombinación específica de lugar para clonar simultáneamente varios fragmentos de DNA en el orden y orientación correctos. Se usó el equipo comercial *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination (Invitrogen)*. La diferencia entre el sistema *Multisite* y el anteriormente descrito se encuentra en las secuencias *atts*. En el caso de querer clonar 2 fragmentos, en las PCRs se introducen las secuencias *attB1* y *attB5r* en uno de los fragmentos, y las secuencias *attB5* y *attB2* en el otro fragmento. Estos dos fragmentos de DNA se clonan en los vectores donadores pDONOR221 P1-P5r y pDONOR221 P5-P2 respectivamente, para generar 2 *entry clones*, los cuales se recombinarán con el vector destino de interés, generándose el vector de expresión deseado. En este sistema, los *entry clones* y los vectores destino presentan las mismas características que en el sistema simple anteriormente explicados.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados son:

*attB1* (*forward*): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAACC(GEN)-3'  
*attB1* *Kozak*

*attB5R* (*reverse*): 5'-GGGGACAAC TTTTGTATACAAAGTTGT-(GEN)-3'  
*attB5R*

*attB5* (*forward*): 5'-GGGGACAAC TTTTGTATACAAAAGTTGNN -(GEN)-3'  
*attB5*

*attB2* (*reverse*): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TAG-(GEN)-3'  
*attB2* *stop*

Se ha de tener en cuenta que si se quieren clonar 2 fragmentos de DNA para generar 2 proteínas de fusión, al primer fragmento se le ha de eliminar el

codón de parada cuando se introducen las secuencias *attBs* por PCR (en el caso del *attB5R*), ya que si no es así, solo se expresará una de las dos proteínas (la primera). La reacción de LR está optimizada para las siguientes relaciones:

Vector Destino	20 fmols
<i>Entry clone 1</i>	10 fmols
<i>Entry clone 2</i>	10 fmols
Agua MilliQ	5 $\mu$ l (volumen final)
LR clonasa plus	1 $\mu$ l

Donde los fmols de DNA se convierten en ng utilizando la fórmula:

$$\text{ng} = (x \text{ fmols}) (N) (660 \text{ fg} / \text{fmoles}) (1 \text{ ng} / 106 \text{ fg})$$

donde x es el número de fmoles y N el tamaño del DNA en pares de bases (pb). La mezcla se incubó a 25°C toda la noche. La reacción se para con 0,5  $\mu$ l de Proteinasa K, a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, se transforma 0,5 - 1  $\mu$ l de la reacción en bacterias DH5 $\alpha$  como se explica anteriormente.

### **1.3.2.5 Utilización del software *Vector NTI* para la construcción virtual de clones.**

Se utilizó el programa *Vector NTI Advance*, proporcionado por *Invitrogen*, para el diseño virtual de clones mediante el sistema *Gateway*. Dicho programa no sólo ofrece la posibilidad de efectuar recombinaciones virtuales para el diseño de mapas, sino que también permite diseñar oligonucleótidos que contienen las secuencias *att*, integrar virtualmente hasta 4 insertos en un vector, guardar en una base de datos todos los mapas elaborados, hacer restricciones, etc.

### 1.3.3 Construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida.

#### 1.3.3.1 Reacción de PCR.

La reacción de PCR en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) es un sistema “*in vitro*” que permite la amplificación selectiva de fragmentos de DNA de doble cadena de manera exponencial, utilizando una polimerasa termostable y oligonucleótidos cebadores específicos del fragmento de ADN a amplificar (Saiki et al., 1988). Consiste en ciclos sucesivos de desnaturalización de la doble cadena, hibridación de la cadena sencilla con oligonucleótidos cebadores que poseen una secuencia complementaria a la que se pretende amplificar, y extensión de las cadenas de oligonucleótidos, mediante una polimerasa termoestable. En cada ciclo, idealmente, se dobla el número de copias fragmento en cuestión, por lo que se obtiene una amplificación exponencial a partir de un número de copias inicial bajo. Cada fragmento de DNA a amplificar presenta unas características diferentes, al igual que los cebadores y la polimerasa. Por ese motivo es conveniente optimizar las condiciones para cada fragmento en particular.

El correcto diseño de oligonucleótidos cebadores constituye un factor clave a la hora de obtener éxito en la PCR. Existen, por tanto, una serie de criterios que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar dichos oligonucleótidos:

- 1) El número de A + T, debe ser similar al número de C + G.
- 2) El extremo 5' debe presentar una energía libre de Gibbs muy negativa (lo que nos asegura una unión muy fuerte), y el extremo 3', menos negativa (asegurándonos una unión específica, ya que la desestabilización provocada por un nucleótido no emparejado podrá provocar la no-unión del

oligonucleótido). 3) Existencia de una C o una G en el extremo 3', ya que la unión C-G es muy estable, y ayudará a la polimerasa a iniciar su proceso.

4) Es conveniente evitar oligonucleótidos que puedan formar estructuras internas estables a la temperatura a la que se tengan que utilizar (generalmente alrededor de 55°C), o que presenten secuencias complementarias que permitan la formación de dímeros, especialmente si éstos presentan una estructura tal que dejen extremos 5' protuberantes.

Las condiciones generales de una PCR clásica son las siguientes:

Inicio: 3 minutos a 95°C	} 25-35 ciclos
Desnaturalización: 30 segundos a 95°C	
Hibridación: 30 segundos a 46-62°C	
Elongación: Entre 30 segundos y 4 minutos a 74°C	
Extensión final: 5-10 minutos a 74°C	
Fase final: se deja a 4°C o a temperatura ambiente	

El tiempo de elongación depende de la longitud del fragmento a amplificar (generalmente 1 minuto por 1 Kb), y la temperatura de hibridación depende de la secuencia del oligonucleótido. Se calcula en °C, mediante la siguiente fórmula:  $T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] - 4$

En el caso de que el oligonucleótido no sea totalmente complementario al DNA, la temperatura de hibridación se reduce, con el fin de facilitar una unión no totalmente específica.

### 1.3.3.2 Construcción de mutantes por PCR recombinante.

El método de PCR recombinante nos permite introducir mutaciones puntuales en el DNA, inserciones y deleciones relativamente largas. La técnica consiste en realizar 2 fragmentos de PCR que contienen la mutación. Estos dos fragmentos contienen una región de solapamiento que es igual y que contiene la mutación de interés, lo cual permite utilizarlos como molde para la

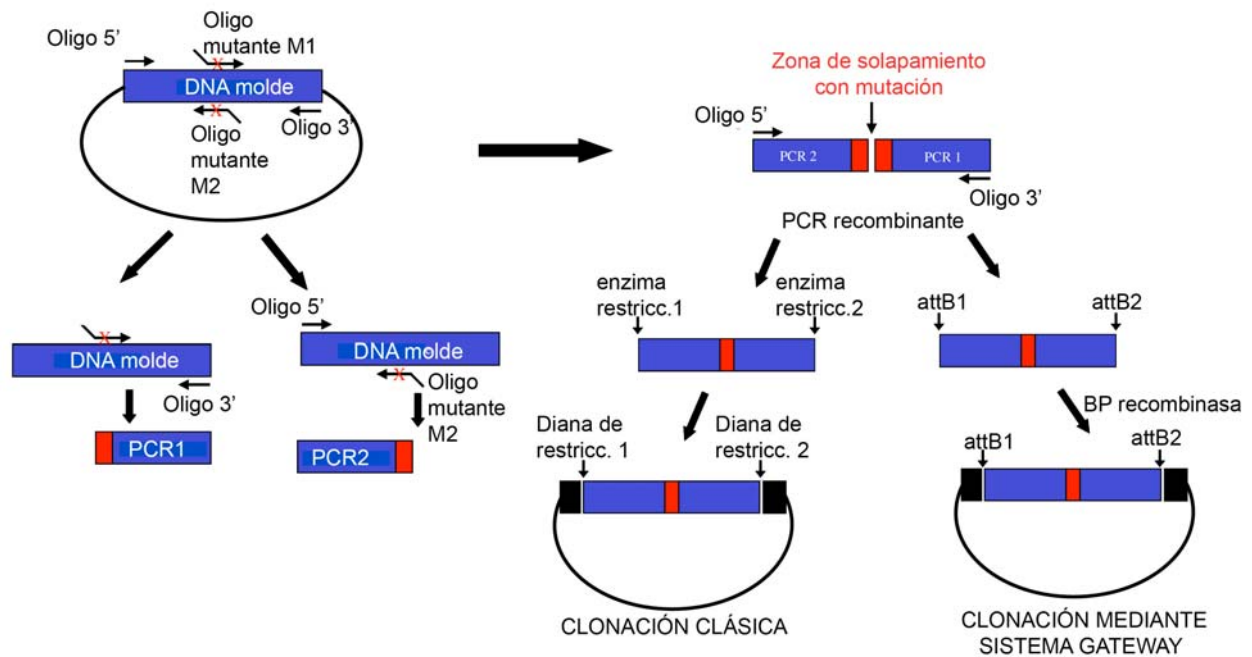
siguiente PCR de recombinación, haciendo servir los cebadores de los extremos 5' y 3'. La mutación que se desea insertar se introduce en el oligonucleótido cebador, con lo que su secuencia no será totalmente complementaria a la secuencia de la cadena molde. Es por ello que deben ajustarse las condiciones de la PCR. Así, se ha reducido el número de ciclos a 25 para disminuir la probabilidad de que se generen mutaciones, y se ha partido de una gran cantidad de DNA como molde. Asimismo, la temperatura de hibridación del cebador ha sido generalmente 55°C.

En dos tubos de PCR se elaboran ambas PCRs, la PCR1 y la PCR2. Tras efectuarlas, se testan en un gel de agarosa y se purifican. Ambas PCRs purificadas, se utilizan como molde para la PCR recombinante. Los reactivos para cada una de estas PCRs han sido los siguientes:

<u>PCRs parciales</u>		<u>PCR recombinante</u>	
DNA molde (100 ng/μl)	2 μl	PCR 1	5 μl
Tampón <i>KOD</i> (10x)	5 μl	PCR 2	5 μl
dNTPs (10 mM)	5 μl	Tampón <i>KOD</i> (10x)	10 μl
MgCl <sub>2</sub>	3 μl	dNTPs (10 mM)	10 μl
Oligo <i>sense</i> (10μM)	1,5 μl	MgCl <sub>2</sub>	6 μl
Oligo <i>antisense</i> (10μM)	1,5 μl	Oligo <i>sense</i> (10μM)	3 μl
<i>KOD hot Start Polimerasa</i>	1 μl	Oligo <i>antisense</i> (10μM)	3 μl
Agua MiliQ	31 μl	<i>KOD hot Start Polimerasa</i>	2 μl
		Agua MiliQ	66 μl

La PCR recombinante vuelve a verificarse en un gel de agarosa y se purifica, obteniéndose entonces el fragmento de DNA con la mutación. Finalmente se procede a clonar dicho fragmento en un vector de interés, ya sea por el método clásico o por el sistema Gateway. En el siguiente esquema pueden observarse los pasos a seguir para la construcción de un mutante mediante la técnica de la PCR recombinante.





**Figura 25. Esquema gráfico del método de mutagénesis por PCR recombinante.** En primer lugar se efectúan dos PCRs parciales: una de ellas (PCR1) utilizando un oligonucleótido *sense* a cierta distancia hacia 5' de la región donde se insertará la mutación, y un *antisense* que contenga la mutación. La segunda PCR (PCR2), se obtiene a partir de un oligonucleótido *sense* con la mutación, y un *antisense* a cierta distancia hacia 3'. Ambas PCR presentan una región de solapamiento (en rojo), que contiene la mutación. A continuación, ambos fragmentos se amplifican en una PCR recombinante, utilizando los oligonucleótidos de los extremos 5' y 3', obteniéndose el fragmento de interés con la mutación en cuestión. Dicho fragmento puede, bien ser digerido por sus extremos con el fin de ser clonado en el vector de expresión de interés, bien recombinar mediante una BP clonasa con un vector donador para generar un vector de entrada usando la metodología *Gateway*.

## 1.4 OBTENCIÓN DE RNA, RT-PCR, CONSTRUCCIÓN E INYECCIÓN DE RNA MENSAJERO TRANSCRITO “*IN VITRO*”.

### 1.4.1 Normas generales para la manipulación de RNA.

Para la manipulación del RNA es necesario recurrir a tratamientos especiales, ya que se trata de una molécula fácilmente degradable. Tanto la manipulación como las soluciones deben estar libres de la presencia de RNAsas. Para ello, es conveniente tener en cuenta ciertas medidas de precaución:

- 1) La manipulación debe efectuarse con guantes, ya que las manos son una fuente muy importante de RNAsas.
- 2) El material de vidrio debe estar tratado a 200°C durante un tiempo mínimo

de 4 horas.

3) El material de plástico utilizado (tubos *ependorf*, puntas de pipeta automática, etc) debe ser autoclavado durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y manipulado siempre con guantes.

4) Los *stocks* de los reactivos utilizados deben ser libres de RNAsa y no se deben introducir espátulas en su interior.

5) Las varillas magnéticas y los materiales que estarán en contacto con soluciones libres de RNAsa deben tratarse previamente a 200°C.

6) Los reactivos se pesan directamente sobre recipientes libres de RNAsa o sobre papel de aluminio que no haya estado en contacto con ninguna fuente de contaminación. En caso de que el reactivo sea susceptible al autoclavado, éste debe ser diluido en agua MiliQ, y es posible medir su pH con un pHmetro de forma convencional, es decir, sin necesidad de condiciones libres de RNAsas; posteriormente, la muestra es autoclavada y las RNAsas son eliminadas. En caso de que la muestra no se pueda autoclavar, se trata con agua DEPC (ver apéndice), y el pH se mide utilizando tiras de pH, sobre las que se deposita un pequeño volumen de la solución. La electroforesis debe efectuarse sobre cubetas previamente tratadas con etanol y reservadas exclusivamente para experimentos con RNA.

#### **1.4.2 Obtención de RNA.**

Se procedió a la extracción de RNA a partir de células HeLA crecidas en monocapa y se llevó a cabo siguiendo dos protocolos diferentes: uno mediante el uso de Trizol (*Invitrogen*), y otro usando el *kit* comercial *Nucleo Spin RNA II* (*Macherey-Nagel*).

#### 1.4.2.1 Obtención de RNA mediante el uso de Trizol.

El RNA que se quería obtener provenía de células HeLa que estaban crecidas en un pocillo de 35 milímetros de diámetro. El proceso de obtención consta de varias fases:

- Homogenización.

Se lisan las células con 0,9 ml de trizol y se resuspenden bien con la pipeta, pasándolas a un nuevo tubo *ependorf*.

- Separación de fases.

Se incuba el homogenado durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 0,2 ml de cloroformo y se agita el *ependorf* fuertemente con la mano durante aproximadamente 15 segundos. Tras ello, se incuba unos 3 minutos a temperatura ambiente.

Se lleva a cabo una centrifugación a 12000 g durante 15 segundos a temperatura ambiente, obteniéndose una mezcla de fases.

- Precipitación del RNA.

Se transfiere con cuidado la fase acuosa y se deposita en un nuevo tubo (guardar la fase orgánica si se quiere aislar DNA o proteína).

Se precipita el RNA añadiendo 0,5 ml de isopropanol y tras mezclar bien se procede a una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente.

Entonces se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a la misma temperatura y se elimina el sobrenadante.

- Lavado del RNA

El *pellet* resultante se lava con 1 ml de etanol al 75%, mezclando bien mediante vórtex.

Se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante.

#### - Redisolución del RNA

Se deja secar el *pellet* entre 5 y 10 minutos al aire o haciendo vacío, pero teniendo cuidado de no dejarlo secar completamente porque puede disminuir su solubilidad.

Se re-disuelve el RNA añadiendo agua carente de RNAsas (varía en función del *pellet* obtenido). En este paso es importante no hacer vórtex. Se mezcla con el dedo o con una pipeta libre de RNAsa con cuidado. Si no termina de disolverse puede incubarse durante 5 - 10 minutos a 55 - 60°C.

En este punto se procede a tratar el RNA obtenido con DNAsa para intentar eliminar los restos de DNA que puedan quedar. Normalmente se tratan las muestras durante 10 minutos bien a temperatura ambiente, bien a 37°C. En nuestro caso, al querer intentar eliminar el máximo posible del DNA plasmídico, llegamos a tratar las muestras durante 45 minutos a 37°C.

Finalmente la muestra puede ser valorada en el *nanodrop* y guardada a -20 °C o -80 °C.

#### **1.4.2.2 Obtención de RNA mediante el uso del *kit* comercial *NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)*.**

##### - Homogeneizar y lisar las células.

Se colectan las células en un *pellet* y se añaden 350 µl del buffer RA1 y 3,5 µl de β-mercaptoetanol. Se mezcla y se agita con vórtex vigorosamente.

##### - Filtrado del lisado.

Se procede a filtrar el lisado para reducir la viscosidad del mismo a través de unos filtros especiales que vienen en el *kit* (*NucleoSpin® Filter*). El filtrado se recoge en un tubo gracias a la centrifugación de la muestra durante 1 minuto a 11000 g.

Se añaden 350 µl de etanol al 70% al lisado filtrado y homogeneizado y se mezcla mediante el pipeteo de unas 5 veces.

- Unión del RNA.

Se hace pasar el lisado por una columna especial que viene en el *kit* (*NucleoSpin® RNA II Column*), la cual se coloca sobre un tubo *ependorf* colector.

Se procede a centrifugar el lisado durante 30 segundos a 11000 g y se coloca la columna sobre otro tubo colector.

Se añaden 350 µl de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) y se centrifuga a 11000 g durante 1 minuto para secar la membrana de la columna.

- Digestión del DNA.

Se lleva a cabo una reacción con DNAsa en un tubo estéril. Se añaden 10 µl de DNAsa por cada 90 µl de *buffer*. Se mezcla bien y se añaden directamente sobre el centro de la membrana de la columna, y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- Lavado y secado de la membrana.

Se añaden 200 µl del *buffer* RA2 (inactiva la DNAsa) a la columna y se centrifuga durante 30 segundos a 11000 g. Se pasa la columna a un nuevo tubo colector.

Posteriormente se añaden 600 µl de *buffer* RA3 y se vuelve a centrifugar durante 30 segundos a 11000 g. Se descarta el sobrenadante y se coloca la columna en un nuevo tubo colector.

Finalmente se procede al tercer y último lavado de la columna. Se añaden 250 µl del *buffer* RA3 y se centrifuga durante 2 minutos a 11000 g para terminar de secar la membrana completamente. Se descarta el sobrenadante y se

transfiere la columna a un nuevo tubo *ependorf* libre de RNAsa.

- Elución del RNA.

Se eluye el RNA añadiendo 50  $\mu$ l de agua libre de RNAsa y centrifugando a 11000g durante 1 minuto. Así, obtenemos el RNA que lo tenemos listo para ser valorado y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.4.2.3 PCR en transcripción reversa (RT-PCR).

La RT-PCR es una variante de PCR, donde una hebra de RNA es retro-transcrita en DNA complementario (cDNA) usando una enzima denominada transcriptasa reversa. El resultado puede posteriormente amplificarse en una PCR tradicional.

Para hacer la transcripción reversa se usó el *kit* de *Invitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* y se siguió el protocolo siguiente:

RNA	2 $\mu$ l	}	5 minutos a $65^{\circ}\text{C}$
Randon Hexámeros	1 $\mu$ l		
dNTP mix	1 $\mu$ l		1 minuto en hielo
Agua libre de RNAsa	6 $\mu$ l		
Buffer 10x	2 $\mu$ l	}	10 minutos a $25^{\circ}\text{C}$
MgCL <sub>2</sub>	4 $\mu$ l		
DTT	2 $\mu$ l		50 minutos a $50^{\circ}\text{C}$
RNAasa OUT	1 $\mu$ l		
Super Scritp II (transcriptasa reversa)	1 $\mu$ l		5 minutos a $85^{\circ}\text{C}$
RNAasa H	1 $\mu$ l	20 minutos a $37^{\circ}\text{C}$	

En este punto ya se puede proceder a realizar una PCR convencional para detectar el cDNA que se ha retrotranscrito.

Es importante hacer los controles adecuados (tanto positivos como negativos) para poder creernos el resultado que obtenemos. Por ejemplo, es importante hacer un control negativo de retro-transcripción, donde ponemos el RNA muestra y todos los reactivos excepto la enzima transcriptasa inversa. En este caso, cuando hagamos la PCR no debemos detectar ninguna banda, ya que si no hay retro-transcriptasa, el RNA no puede retro-transcribirse a cDNA y no lo podremos amplificar en la PCR. Además, en la PCR deberían incorporarse muestras sin DNA, para comprobar que los oligonucleótidos cebadores no están contaminados (no debe detectarse banda) y también deberían amplificarse las muestras con cebadores control, por ejemplo, que amplifiquen el cDNA procedente del RNA ribosómico. Esto nos supondría un control interno de que nuestro RNA de partida estaba en buenas condiciones y no se ha degradado durante el proceso.

#### **1.4.3 Construcción de RNA mensajero transcrito *in vitro*.**

Durante esta Tesis se intentaron algunos estudios *in vivo* en el pez cebra introduciéndole algunas de las construcciones que se habían generado. Sin embargo, para poderlas introducir en el pez lo que se hace es introducir las en forma de RNA en estadios de una o dos células, de forma que éste se pueda luego transcribir a DNA y expresarse la proteína de interés. Se crea RNA complementario a partir de un molde de DNA del gen de interés. Este RNA se construye mediante transcripción *in vitro*, por medio de la polimerasa SP6 y el equipo de transcripción *mMESSAGE mMACHINE*. Una vez se obtiene el RNA mensajero, éste es precipitado y diluido en un volumen muy pequeño

de agua DEPC, con el fin de eliminar restos de reactivos y sales que pudieran interferir en la futura maquinaria de traducción.

### REACTIVOS

- Reactivos de transcripción y polimerasa SP6 de *mMESSAGE* *mMACHINE*.
- Agua DEPC.
- Etanol 95% y 70% en agua DEPC.

### METODOLOGÍA

1. Se efectuaron varias construcciones que se clonaron en un vector pCSDest.
2. Fueron digeridos 10 µg de cada construcción con la enzima de restricción Not I, la cual cortaba una vez en el vector pCSDest.
3. El fragmento linearizado fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente purificado.

#### Transcripción "in vitro"

4. En un tubo *ependorf* estéril libre de RNAsa, se inoculan, siguiendo este orden:

2xNTP/CAP	5 µl	}	2h a 37°C
DNA purificado	3 µl		
Buffer 10x	1 µl		
<i>Enzime Mix</i>	1 µl		

5. Tras la incubación se añaden 0,5 µl de Turbo DNAsa y se incuba durante 15 minutos a 37°C.

#### Precipitación

6. Se añaden 40 µl de agua DEPC y 30 µl de la solución de precipitación de LiCl. Se incuba durante toda la noche a -80°C.



7. Se descongelan las muestras en hielo y se centrifugan a 13300 rpm durante 20 minutos a 4°C.
8. Se elimina el sobrenadante con mucho cuidado de no llevarnos el *pellet* de RNA (suele usarse una aguja de insulina para ello).
9. Se procede a lavar el *pellet* con 1 ml de etanol al 70% libre de RNAsa, y se centrifuga durante otros 20 minutos a 13300 rpm a 4°C.
10. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el *pellet*, manteniendo el tubo *ependorf* abierto a temperatura ambiente durante 15 - 30 minutos.
11. Posteriormente se añaden 12 µl de agua DEPC y con una punta libre de RNAsa se resuspende arriba y abajo por la pared donde supuestamente se encuentra el *pellet*.
11. Finalmente, se usa 1 µl de la muestra para cuantificar el RNA en el *nanodrop* y otro µl para correr en un gel y verificar su integridad.

La *cuantificación* de la muestra fue efectuada como se describe en el apartado 1.2.4, y teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml de RNA. El agua que se utiliza, tanto para calibrar el espectrofotómetro, como para disolver las muestras, es agua DEPC.

La *verificación* de la integridad del RNA se lleva a cabo corriendo la muestra en un gel de agarosa al 1%, donde se corren exclusivamente las muestras para RNA (debería utilizarse un equipo de electroforesis de uso exclusivo para RNA, previamente tratado con etanol). La electroforesis se lleva a cabo a una baja intensidad de corriente (unos 60 V). La calidad del RNA es mayor cuanto más nítidas y discretas se observen las bandas en el gel. Un RNA degradado se visualiza en el gel como una mancha continua (*smear*) a lo largo del carril.

### 1.4.5 Inyección de RNA mensajero transcrito *in vitro*

Se procedió a inyectar varios RNAs mensajeros provenientes de varias mutaciones dominantes de *GLIALCAM* ortólogas en el pez cebra, con el fin de poder observar un fenotipo en los peces. Asimismo, también se inyectó el RNA mensajero de la construcción que portaba el gen que codifica para GFP bajo el promotor de zMLC1.

#### MATERIALES Y REACTIVOS

- Inyector de aire comprimido *Xenoworks*.
- Micro-pipetas de vidrio de 1 mm de diámetro interno con filamento.
- Escala calibrada.
- Aceite mineral.
- Medio de incubación: agua con 0,03% de sal marina.
- Rojo fenol al 0,4%.
- KCl libre de RNAsa.
- Huevos de pez cebra en estadio de 1-2 células.
- mRNAs.

#### METODOLOGÍA

El RNA se prepara a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l en un volumen final de 10  $\mu$ l, teniendo en cuenta que debe añadirse rojo fenol a una dilución 1/10. Por ejemplo, si tengo un RNA a 610 ng/ $\mu$ l, he de preparar un tubo *ependorf* con 1,6  $\mu$ l del RNA, 7,4  $\mu$ l de KCl libre de RNAsa y 1  $\mu$ l de rojo fenol. Se recomienda prepararlo el mismo día que se lleva a cabo la inyección.

1. El día que precede a la inyección se juntan los peces hembra y macho en la misma caja (aunque separados).
2. Al día siguiente, a primera hora de la mañana se procede a juntarlos

totalmente, y se espera a que pongan huevos.

3. Mientras los peces ponen huevos, se calibra la pipeta que se va a usar, haciendo inyecciones sobre una gota de aceite mineral, sobre una escala calibrada. Se ajusta el tiempo y la presión de inyección para que la gota tenga un tamaño de 1 nl.
4. Se recogen los peces y se ponen alineados en un molde de agarosa, lo cual facilita la inyección.
5. Se inyecta (las cantidades que se decidan, evitando no excederse ya que mucha cantidad puede ser tóxico). La inyección debe realizarse en estadio de 1 o 2 células, intentando dirigir la inyección justo debajo de la célula.
6. Finalizada la inyección, se quitan los peces del molde de agarosa y se trasladan a una placa de Petri con medio de incubación. Se colocan lo más pronto posible en un incubador a 27°C, y se incuban durante el tiempo deseado.
7. La misma tarde después de la inyección es recomendable mirar los animales, ya que puede ser que haya mortalidad.

Nosotros fuimos observando los peces cada día, intentando encontrar un fenotipo.

## **2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE PROTEÍNAS.**

### **2.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.**

#### **2.1.1 Obtención de proteína total a partir de células y de tejido.**

##### **REACTIVOS**

- PBS 1X.

-Tampón de lisis: PBS 1X, 1% Tritón X-100, más inhibidores de

proteasas (Aprotinina y PMSF a 1mM, Leupeptina y Pepstatina a 2  $\mu$ M).

### METODOLOGÍA

La solubilización de proteínas puede hacerse en condiciones desnaturizantes, con detergentes iónicos que rompen toda unión covalente, como por ejemplo el SDS; o bien, puede hacerse en condiciones no desnaturizantes, con detergentes no iónicos, que son capaces de mantener diferentes tipos de uniones no covalentes (Tritón X-100, Tween-20, digitoxina, etc). En nuestro caso, el detergente que se ha usado mayoritariamente para la obtención de proteínas ha sido el Tritón X-100. Cuando se necesitan los extractos proteicos para hacer inmunoprecipitación, se suelen utilizar otros detergentes más suaves como el n-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM), n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), Fos-choline (Anatrace) o complexolyte 47 de composición desconocida (ya que es propiedad de la empresa *Logopharm*).

● La solubilización de extractos celulares se hace en frío para evitar la desnaturización de las proteínas. Se puede hacer directamente sobre la misma placa de cultivo, o bien tras haber llevado a cabo un *pellet* celular.

En el primer caso, las células se lavan 2 veces con PBS para eliminar el exceso del medio de cultivo y se añade sobre las células el tampón de lisis (a 4°C, en hielo). El volumen de tampón de lisis inoculado varía en función del número de células que tenemos, lo cual depende de la superficie o del diámetro de la placa donde han sido cultivadas. Así, células procedentes de una placa de 100 mm de diámetro son lisadas generalmente con 0,8 - 1 ml de tampón de lisis. En cambio, células cultivadas en un pocillo de una placa de 6 suelen ser lisadas con aproximadamente 150-300  $\mu$ l de tampón si son células

HeLa o HEK, porque si son astrocitos primarios y están cultivadas en el mismo tipo de placas, suele utilizarse un volumen más pequeño, alrededor de 75 - 100  $\mu$ l. Las células son raspadas (mediante el uso de un raspador) y, bien resuspendidas se transfieren a un tubo *ependorf*. Entonces la muestra se incuba durante 1 hora a 4°C en un orbital. Posteriormente se procede a centrifugar el lisado a 13000 rpm durante 10 - 15 minutos a 4°C, y se recoge el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción de proteína soluble. Éste está listo para ser valorado, generalmente por el método BCA.

En el segundo caso, si queremos hacer un *pellet* celular, procedemos de la siguiente manera:

- De cada placa de 100 mm, se retira el medio en el que las células se encuentran incubadas con ayuda de una pipeta de cristal acoplada a una bomba de vacío y se inoculan 10 ml de PBS 1X. Con la ayuda de un raspador estéril, se desenganchan las células inmersas en el PBS 1X, y se pasan a un tubo *corning* de 15 ml. El volumen de PBS 1X varía si las células las tenemos en una placa de 6 pocillos.
- Se centrifuga el tubo a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se aspira el sobrenadante y el *pellet* de células es nuevamente lavado con PBS 1X (1 ml), el cual es transferido a un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
- Se vuelve a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se vuelve a aspirar el sobrenadante, quedándonos con el *pellet* de células. Éste puede bien congelarse y guardarse a -20°C para ser utilizado en otra ocasión, o bien puede lisarse con tampón de lisis para proceder a su solubilización. El volumen de tampón de lisis inoculado es proporcional al tamaño del *pellet* de células obtenido (normalmente sigue las relaciones anteriormente explicadas). Cuando

se quieren hacer inmunoprecipitaciones, el extracto proteico tiene que ser fresco, es decir no puede congelarse, sino que el mismo día ha de hacerse la inmunoprecipitación. Lo que sí puede hacerse es congelar el *pellet* de células sin haber sido lisado.

- El homogenizado se incuba en un orbital durante 1 hora a 4°C y se centrifuga el lisado a 13000 rpm durante 10-15 minutos a 4°C, recogándose el sobrenadante, que corresponde a la fracción de proteína soluble.

- Se valora la concentración de proteínas por el método de BCA.

● La solubilización de tejido se hace de manera similar. Las muestras tisulares se conservan a -80°C y se han de procesar utilizando nieve carbónica. Se corta un trozo del tejido con un bisturí y se pone en tampón de lisis con un volumen aproximado de 3 veces el del tejido (a 4°C). Se homogeniza usando un homogenizador, así como se resuspende bien utilizando también las diferentes puntas de las pipetas, consiguiendo que quede todo bien homogenado sin que queden agregados y evitando formar burbujas. Tras obtener el homogenado se procede siguiendo el mismo protocolo anterior.

### **2.1.2 Obtención de proteína total a partir de pez cebra.**

Para solubilizar proteínas de órganos o tejidos procedente del pez cebra adulto, se procede como se ha descrito para la solubilización de tejido. En cambio, para obtener un extracto proteico a partir de peces de estadios embrionarios se ha procedido de diferente manera, usando varios tipos de detergentes, ya que nos costaba detectar la proteína zMLC1 en dichos estadios. Es por ello que se probaron diferentes tipos de detergentes, como el Tritón X-100, el *buffer* RIPA así como lisar directamente con el *buffer* de carga LSB 1X. En cualquier caso, a los peces se les eliminaba previamente el *yolk*

con solución Ringer, y fueron congelados en nitrógeno líquido.

● En el caso de la lisis con el buffer LSB 1X:

- 1) Se añadieron 200 µl en el caso de los peces de 24 horas post-fertilización, o 250 µl en el caso de los peces de 2, 3 o 4 días post-fertilización. En todos los casos disponíamos de alrededor de 100 embriones por *ependorf*.
- 2) Se procedía a disgregar bien los embriones, primero con un homogenizador y luego con una punta amarilla (P200). Asimismo, se incubaba la muestra en un baño de ultrasonidos para favorecer la completa disgregación durante 5 minutos. Nuevamente, se volvía a homogenizar con la punta amarilla (se evitaba usar la aguja de insulina debido a que disponíamos de poco líquido, y el uso de tales agujas hace que se pierda una parte importante de material).
- 3) Finalmente se calentaba la muestra a 60°C durante 10 minutos. Después, se llevaba a cabo una centrifugación rápida y la muestra ya estaba preparada para ser procesada por Western blot (WB). También podía ser guardada a -20°C.

Debido al uso del tampón de carga LSB 1X para la obtención del extracto proteico (el cual es de color azul), no se podía hacer una valoración de la concentración de proteína.

● En el caso de la lisis con Tritón X-100 o el buffer RIPA:

- 1) Se añadían las mismas cantidades de detergente anteriormente citadas (200 µl en el caso de 1 día, y 250 µl en el caso de 2, 3, 4 o 5 días), ya que se disponían del mismo número de embriones (unos 100 por *ependorf*).
- 2) Se llevaba a cabo la disgregación de la misma manera, primero con un homogenizador y luego con una punta amarilla (P200).
- 3) Posteriormente se incubaban en un orbital a 4°C durante 1 hora.

Seguidamente se llevaba a cabo una centrifugación de 10 minutos a 13000rpm a 4°C.

4) Se guardaba el sobrenadante, ya que es la fracción proteica soluble y se cuantificaba la concentración de proteínas por BCA.

Una vez obtenidos los extractos proteicos procedentes de los peces de estadio embrionario o de estadio adulto, se podían testar por WB, llevando a cabo la inmunodetección con el anticuerpo de interés. En nuestro caso, se usó un anticuerpo contra la proteína zMLC1. Como control de carga y como control de que el extracto proteico estuviera bien hecho y en buenas condiciones, también se llevó a cabo una inmunodetección contra una proteína del pez no relacionada con zMLC1, como era el caso de la  $\beta$ -tubulina acetilada.

### **2.1.3 Determinación de la concentración proteica.**

Tras realizar procesos de extracción o purificación de proteínas, es necesario conocer su concentración, no sólo para evaluar el rendimiento de la extracción, sino también para establecer un correcto análisis de futuros experimentos realizados con dichas proteínas. Los métodos de valoración de la concentración de proteínas en este estudio han sido dos: el método de Bradford y el método de BCA.

#### **a) Método de Bradford.**

Este método se basa en la propiedad del colorante Coomassie azul brillante G-250 de unirse a proteínas, desplazándose su máximo de absorción de 465 a 595 nm. La absorción de la solución de la muestra a 595 nm sirve como magnitud de medición para la concentración de proteínas. El colorante posee afinidad con los aminoácidos básicos y aromáticos. Este método es incompatible con muestras que contengan detergentes, pues puede dar valores



erróneos.

### MATERIALES

- Placa de ELISA de 96 pocillos.
- Lector de ELISA (Biotek).

### REACTIVOS

- Solución Comercial *BioRad Protein Assay* (Coomassie azul brillante G-250, ácido fosfórico y metanol), diluida 1/5 en agua destilada filtrada.
- Solución de BSA (albúmina bovina) a 2 mg/ml en agua mili-Q.

### METODOLOGÍA

1. Es conveniente tener en cuenta el tipo de muestras que se van a tratar. Así, por ejemplo, los extractos de membranas totales a partir de tejidos, presentan una concentración de proteína muy elevada, con lo que suele ser necesario diluirlas. Sin embargo, las muestras procedentes de células suelen procesarse directamente.
2. Se prepara la cantidad necesaria de reactivo de Bradford (diluido 1/5 en agua destilada), teniendo en cuenta que se necesitan 200  $\mu$ l por cada pocillo, y que, para cada punto de la patrón, así como para cada muestra, se efectuarán 2 réplicas.
3. En los primeros pocillos de la placa de ELISA, se inoculan los distintos puntos necesarios para efectuar la recta patrón (2 réplicas por punto). La patrón se ha efectuado con 0, 0,5, 1, 2 y 5 mg de proteína (BSA) en un volumen final de 10  $\mu$ l. En los pocillos siguientes, se inoculan 2 réplicas de entre 1 y 5  $\mu$ l de cada muestra (volumen final también de 10  $\mu$ l).
4. Se inoculan 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (*BioRad*) diluido. Posteriormente se agita la placa y se mide en un lector de ELISA a una

absorbancia de 595 nm.

#### b) Método de BCA

Es conveniente valorar las muestras solubilizadas con detergente por esta metodología. El método del Ácido Bicinchonínico (BCA) (*Protein Assay Reagent*, 23225), se ha realizado siguiendo las especificaciones del fabricante (*Pierce*). Este método se basa en la propiedad que tienen los enlaces peptídicos en solución alcalina de reducir el  $\text{Cu}^{+2}$ . Los iones  $\text{Cu}^+$  producidos, se unen a dos moléculas de BCA, lo que se traduce en un cambio de su estructura electrónica, de tal manera que absorben luz a 562 nm, formando un compuesto de color púrpura. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. No son compatibles para este método las muestras que contengan 100 mM de EDTA, 1 mM DTT y 20% de  $\text{NH}_3\text{SO}_4$ .

#### MATERIALES y REACTIVOS

- Placa de ELISA de 96 pocillos.
- Lector de ELISA (*Biotek*).
- Solución comercial (*Pierce*): Reactivo A (BCA, en condiciones alcalinas) y Reactivo B (4% de sulfato de cobre). La mezcla se efectúa a un ratio de 50 ml de reactivo A por cada ml de reactivo B.
- Solución *stock* de albúmina bovina (BSA) (2 mg/ml) en tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM) pH 7.4, conservada a temperatura ambiente.

#### METODOLOGÍA

El método se lleva a cabo de modo similar al método de Bradford. Se hace la recta patrón por duplicado (0, 0,5, 1, 2, y 5 mg) al igual que las

muestras (todo en un volumen final de 10  $\mu$ l). Se añaden 200  $\mu$ l por pocillo del reactivo que corresponde a la solución comercial (*Pierce*). En este caso, se debe dejar reaccionar el reactivo con las muestras durante 20 - 30 minutos a 37°C. Finalmente, se procede a efectuar la lectura mediante el lector de ELISA a 595 nm.

## **2.2 ENSAYO DE WESTERN-BLOT (WB).**

El Western-blot es una técnica muy utilizada en biología molecular, ya que permite la detección específica de proteínas a partir de muestras biológicas. Dicha técnica aporta información acerca del tamaño de la proteína, así como de muchas de sus características bioquímicas (oligomerización, fosforilación, glicosilación u otras características que influyen la migración electroforética). El proceso se lleva a cabo en distintas etapas:

1. Electroforesis *SDS-PAGE*.
2. Transferencia.
3. Inmunodetección.

### **2.2.1 Electroforesis *SDS-PAGE*.**

La electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida con SDS es un sistema clásico de separación de proteínas en función de su peso molecular. El método se basa en que las proteínas contenidas en una solución de SDS (detergente aniónico) son capaces de migrar bajo un campo eléctrico. El SDS contenido en el tampón de carga de las muestras confiere a las proteínas una carga negativa, manteniendo la relación carga/masa constante. Si se someten dichas preparaciones a un campo eléctrico establecido sobre una malla de polímero de acrilamida/bisacrilamida, las proteínas migrarán

desde un polo negativo hacia un polo positivo en función de su peso molecular. En este tipo de electroforesis, se preparan dos tipos de geles: un gel concentrador, cuya función consiste en alinear las proteínas antes de llegar a cabo la separación de éstas, y un gel separador, que, como su nombre indica, separa las proteínas según su peso molecular. La concentración de acrilamida del gel separador dependerá del tamaño de la proteína que se va a someter a migración. Así, la separación de proteínas con un peso molecular menor será más eficiente en geles más concentrados, y viceversa. Junto con las muestras problema, se hacen migrar estándares de peso molecular conocido y preteñidos, como marcadores para conocer el tamaño de la proteína problema.

### MATERIALES

- Extractos de proteína total a partir de células o de tejidos en tampón de carga.
- Sistema *Mini-Protean* (*BioRad*).
- Fuentes de corriente eléctrica.
- Pipeta *Hamilton* de 50  $\mu$ l.

### REACTIVOS

- Tampón de electroforesis 10X (Tris base 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1%). Se usa a 1X.
- Tampón de carga de las muestras LSB 4X (Para 40 ml: 8 ml Tris-HCl 2M, pH 6.8; 32 ml glicerol; 3,2 g SDS; 160  $\mu$ l de azul de bromofenol). Se usa a 1X.
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (*BioRad*).
- APS (Persulfato de amonio 10% en agua).
- TEMED.

- Solución gel separador (1,5 M Tris HCl, pH 8.8, 0.1% SDS).
- Solución gel concentrador (0,5 M Tris HCl, pH 6.8, 0.1% SDS).
- DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Estándars de peso molecular preteñidos (*BioRad* o *Fermentas*).

### METODOLOGÍA

1. *Preparación de las muestras.* La mezcla se realiza siempre en contacto con hielo (4°C). En un tubo *ependorf* se deposita la cantidad de proteína deseada (entre 1 y 100  $\mu$ g por muestra), a la que se añade el tampón de carga LSB para que quede a una concentración final de 1X. Cuando las muestras se preparan en condiciones reductoras, se añade DTT a una concentración final de 100 mM o 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se calientan en un termo-agitador y la temperatura dependerá del tipo de proteína a inmunodetectar. Para proteínas de membrana, las muestras se procesan a 60°C durante 2 - 5 minutos para evitar que se formen agregados. En cambio, para proteínas citosólicas, las muestras se procesan a 95°C durante 5 minutos. Se da un *spin* a las muestras y ya están listas para ser cargadas en el sistema de electroforesis.

2. *Polimerización del gel.* Previamente al montaje del sistema de electroforesis, se lavan con etanol todas las piezas que estarán en contacto con las proteínas. El sistema se monta según las indicaciones del fabricante. El APS y el TEMED son los últimos reactivos que se mezcla en la solución del gel separador. En la siguiente tabla se muestran las relaciones de los distintos reactivos para los diferentes porcentajes de los geles de acrilamida.

<b>SEPARADOR x 2geles 1.5mm, 20ml</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>CONCENTRADOR x 2geles 1.5mm, 20ml</b>	<b>4%</b>
<b>Acrilamida 40%</b>	3,8 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml	<b>Acrilamida 40%</b>	1 ml
<b>Sol.separación</b>	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	<b>Sol.concentración</b>	2,5 ml
<b>Agua</b>	11 ml	9,8 ml	8,8 ml	7,3 ml	<b>Agua</b>	6,5 ml
<b>APS</b>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	<b>APS</b>	200 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	<b>TEMED</b>	20 $\mu$ l

Se mezcla ligeramente por inversión y se deposita lentamente entre los dos vidrios del sistema, con una pipeta Pasteur, con la precaución de que no se formen burbujas. El gel separador deberá ocupar aproximadamente las 3/4 partes inferiores del sistema. Antes de su polimerización, se añade lentamente una capa de isopropanol en la parte superior del gel para permitir que el límite superior del gel quede recto. Una vez polimerizado el gel separador, se decanta el isopropanol, se lava con agua y se deposita el gel concentrador. Rápidamente se coloca el peine, antes de que se produzca la polimerización del gel concentrador. A continuación se monta el sistema de vidrios con los geles polimerizados en la cubeta de electroforesis, que se llena de solución de electroforesis 1X, de manera que haya una continuidad eléctrica.

3. *Migración del gel.* Se extrae el peine y se cargan las muestras con una pipeta *Hamilton* de 50 µl. Se cierra el circuito con la tapa de la cubeta y se conecta a una fuente de alimentación a una corriente constante de 100-140 V, hasta que el marcador de peso molecular se haya separado lo suficiente como para poder detectar la proteína de interés.

### **2.2.2 Transferencia.**

Una vez terminada la separación electroforética, las proteínas se electrotransfieren a una membrana porosa de fluoruro de polivinilido (PVDF), de manera que queden inmovilizadas, permitiendo su posterior inmunodetección.

#### **MATERIALES**

- Cubeta de transferencia, con los casetes de transferencia correspondientes y esponjas (Sistema de Western-Blot *MiniProtean* de *BioRad*).
- Papel *Whatmann* 3MM (dos rectángulos por cada gel, de la misma

medida que el gel separador).

- Membrana *Immobilon-P* (Millipore) (un rectángulo de membrana de transferencia por cada gel, del mismo tamaño que el gel separador).

### REACTIVOS

- Tampón de transferencia 10X (250 mM Tris base, 1,92 M glicina, pH 8.3). Se usa a 1X + 20% metanol. El mismo tampón se utiliza para el montaje de los casetes.
- Agua destilada.
- Metanol.

### METODOLOGÍA

Todo el proceso debe llevarse a cabo con guantes.

1. Primero, se procede a hidratar la membrana de manera que sea receptiva a inmovilizar proteínas. Para ello, se sumerge la membrana en una cubeta con metanol absoluto durante 5 minutos, y a continuación, en otra cubeta con agua destilada durante otros 5 minutos. Finalmente se deja equilibrar en el tampón de transferencia.
2. Los casetes de transferencia, las esponjas, y los papeles *Whatmann* se sumergen en tampón de transferencia durante unos minutos. Se coloca el casete abierto con la cara oscura al fondo. A continuación, sobre la cara oscura, se coloca una de las esponjas, un papel *Whatmann* y el gel separador (al que previamente se le ha extraído el concentrador), por este orden. Posteriormente se coloca la membrana de manera que no se formen burbujas entre el gel y la membrana, ya que la formación de burbujas impide la transferencia proteica. Sobre la membrana se coloca el otro papel *Whatmann* y otra esponja, y se procede a cerrar el sándwich. Esta disposición permite un

flujo del tampón siguiendo el campo eléctrico desde el gel hacia la membrana, transfiriendo las proteínas inmovilizadas en el gel en dicha membrana.

3. El casete de transferencia se coloca en la cubeta, previamente cubierta con tampón de transferencia, de forma que la cara oscura coincida con el polo negativo, ya que las proteínas se transferirán en esa dirección. También se deposita una placa de hielo para evitar el sobre-calentamiento del sistema. El tiempo de transferencia depende del tamaño de la proteína; así, cuanto mayor es el peso molecular de ésta, mayor tiempo de transferencia es necesario aplicar. Generalmente se ha aplicado 280 mA durante 100 minutos o toda la noche a 35 V en frío.

### **2.2.3 Inmunodetección.**

Una vez realizada la transferencia se procede a la detección de la proteína de estudio inmovilizada sobre la membrana, mediante anticuerpos específicos. Durante este trabajo se han realizado WBs contra diferentes proteínas utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales que se describirán en cada uno de los apartados de resultados.

#### **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Solución de *Pounceau* (ácido acético 5% en agua + 0,1% *pounceau*).
- Solución de bloqueo (5% de leche en polvo en TTBS 1X).
- Anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo.
- Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (diluidos 1/10000 en solución de bloqueo).
- Solución de lavado: TTBS 1X (TBS 1X, 0.1% Tritón X-100).
- Reactivo ECL para el revelado (ver apéndice de soluciones).
- *Hiperfilms* (Amersham) y casete de revelado.



## METODOLOGÍA

1. Las membranas de la transeferencia son depositadas en una cubeta con solución de *Pounceau*, la cual teñirá las proteínas. Así se puede comprobar que la transferencia ha funcionado bien. Se puede observar si han quedado o no burbujas. La membrana se destiñe con la misma solución de transferencia.
2. *Bloqueo de la membrana.* Es necesario bloquear la membrana para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos a las proteínas electro-transferidas. Para ello, se preincuba la membrana con una solución rica en proteínas (leche, en este caso), que se unirá a los lugares de interacción inespecífica. Para ello, se incuba la membrana en solución de bloqueo durante 60 minutos en agitación suave a temperatura ambiente.
3. *Incubación con anticuerpo primario.* El anticuerpo primario debe diluirse igualmente en solución de bloqueo, de forma que se establezca una cierta competencia entre las proteínas de la leche (uniones inespecíficas) y el anticuerpo (uniones específicas), de modo que el anticuerpo no tenga otra posibilidad que unirse a su proteína específica contra la que está dirigido. La incubación se lleva a cabo en una bolsa de plástico *Glad* sellada, que contiene la membrana bloqueada y la solución de incubación con el anticuerpo primario (1-3 ml) y se mantiene en agitación suave durante 60 minutos a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C.
4. *Lavado.* Con el fin de retirar el exceso de anticuerpo primario de la superficie de la membrana, se efectúan 3 lavados de 10 minutos cada uno, con la solución de lavado en agitación suave, a temperatura ambiente.
5. *Incubación con anticuerpo secundario.* Para detectar las uniones específicas del anticuerpo primario con la proteína de estudio, la membrana se

incuba con anticuerpos especie-específicas para inmunoglobulinas G (IgGs), conjugados con la enzima peroxidada. Esto permite detectar la interacción mediante una reacción hidrolítica que genera luz. El anticuerpo secundario se diluye también en solución de bloqueo (1:10000) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se vuelven a efectuar 3 lavados de 10 minutos y en agitación con la solución de lavado.

6. *Revelado*. El revelado se hace incubando la membrana con una solución que contiene luminol, compuesto que al ser hidrolizado por la peroxidada genera luz. Esta luz se detecta mediante la exposición de la membrana sobre un *film* fotográfico. Se incuba la membrana con la solución de ECL durante 1 minuto y se retira el exceso. El revelado se lleva a cabo en una cámara oscura con la ayuda de un casete de revelado, efectuando exposiciones a diferentes tiempos sobre el papel fotográfico *hiperfilm* de alta sensibilidad. Los *films* se revelan con un sistema de revelado fotográfico.

### **2.3 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.**

Contando con los servicios proporcionados por *EUROGENTEC*, se inmunizaron dos conejos para la obtención de un anticuerpo contra la proteína MLC1 de pez cebra. Se diseñó un péptido sintético correspondiente a la región N-terminal de dicha proteína, y se seleccionó, por predicción informática, una región con un nivel de antigenicidad relativamente alto y que no mostrase homología con otras proteínas. Además, se eligió la misma región que ya había funcionado muy bien para los anticuerpos que el grupo había generado contra la proteína MLC1 de ratón y de humano. El péptido que se seleccionó es el siguiente: QREEASAEVFSYQMST(C), y corresponde a los aminoácidos 2 -

19 de la proteína. Se realizaron 3 inyecciones en cada animal, y posteriormente se obtuvieron los sueros de cada uno de los conejos. Dichos sueros fueron testados por WB sobre extractos obtenidos a partir de células HeLa transfectadas con MLC1 de pez cebra. Como control negativo se utilizaron los sueros pre-inmunes. Finalmente, se eligió aquel suero donde se detectaba mejor la proteína, y se purificaron las inmunoglobulinas G (IgGs) por afinidad usando su correspondiente péptido.

### **2.3.1 Purificación de IgGs mediante afinidad por el péptido.**

Las IgGs con una mayor señal se seleccionaron y purificaron por afinidad por el péptido. El péptido con el que fue inmunizado el animal del que se obtuvo el suero contenía una cisteína reducida, cuyo grupo sulfidrilo era capaz de acoplarse covalentemente a una resina *SulfoLink* (Pierce), la cual permitía la purificación del anticuerpo a partir del suero a través de dicha columna de afinidad. Mediante una reacción yodo-acetil, el péptido se va a unir covalentemente y de forma estable a la resina. Tras bloquear los lugares de unión inespecíficos, se incubó la columna con el suero. De esta forma, solo los anticuerpos que eran capaces de reconocer el péptido específicamente se unirían a la resina de la columna con el péptido acoplado, eliminándose el suero restante. Estos anticuerpos purificados serían finalmente eluidos de la columna con una solución de pH ácido (2,5).

#### **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Columna de cromatografía *Bio-Rad* de polipropileno de 10 ml de capacidad.
- Resina de acoplamiento *Sulfolink* (Pierce).
- Tampón de acoplamiento 5X (Tris-HCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8.5).

- Solución de bloqueo (Cisteína 50mM en tampón de acoplamiento 1X).
- Solución de lavado (NaCl 1M).
- Solución de mantenimiento (PBS, NaN<sub>3</sub> 1 mM).
- TBS 1X.
- PBS 1X.
- Tris 1 M pH 9.0.
- Tampón de neutralización (Tris 1 M, NaCl 2 M, pH 8.5).
- Tampón de elución (Glicina 100 mM, pH 2.5).
- Suero con IgGs.

### METODOLOGÍA

#### A) Acoplamiento del péptido a la columna.

1. Se prepara 1 mg de péptido en 200 µl de agua miliQ y 50 µl de tampón de acoplamiento 5X. Se mezcla por agitación, hasta conseguir una completa homogenización. Se toma una pequeña muestra (10 µl), la cual rotularemos como “péptido antes del acoplamiento”.
2. En una columna *BioRad (Pierce)* de 10 ml de capacidad, se añaden 2 ml de resina *Sulfolink*, y se equilibra con 6 volúmenes (12 ml) de tampón de acoplamiento 1X (es importante que la columna no quede seca).
3. Tras equilibrarse la columna, se aplica la mezcla de péptido (unos 250 µl) más 2 ml de tampón de acoplamiento 1X. Se tapa la columna y se homogeniza bien la mezcla. Se deja incubar durante 2 horas en un orbital, a temperatura ambiente.
4. Se destapa la columna y se deja caer un poco de la mezcla por gravedad. Se recoge otra muestra, la cual será rotulada como “péptido después del acoplamiento”. Se compara la concentración del “péptido antes del

acoplamiento” y del “péptido después del acoplamiento”, midiendo a una longitud de onda de 280 nm, que nos dará una idea de la cantidad de péptido que se ha quedado unido a la columna. Si vemos que se nos ha unido un porcentaje no muy alto del péptido, aumentamos el tiempo de incubación de la mezcla del péptido con el tampón de acoplamiento y la resina. Si el porcentaje de unión del péptido es aceptable seguimos con el protocolo.

5. Se aplican a la columna 2 ml de solución de bloqueo y se incuba durante 15 minutos en agitación en el orbital a temperatura ambiente, y luego 30 minutos sin agitación (también a temperatura ambiente).

6. Tras dejar caer la solución de bloqueo, se efectúan dos lavados con NaCl 1 M (solución de lavado). A partir de este paso, el péptido se encuentra ya acoplado a la columna cromatográfica, y dicha columna puede ser reutilizada varias veces para la obtención de anticuerpos purificados. Para ello, se añade 1 mM de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) al último lavado con NaCl 1 M y se guarda la columna a 4°C, bien tapada y rotulada.

#### *B) Purificación de suero por afinidad.*

1. Se prepara una dilución del suero en TBS 1X a una relación 1:1 (4 ml de suero en 4 ml de TBS1X). El pH de la mezcla se ajusta a pH 8.5 con Tris 1 M pH 9.0.

2. La columna activada con el péptido se lava varias veces con TBS 1X y se incuba con la mezcla suero/TBS 1X durante 3-4 horas en un orbital a temperatura ambiente.

3. Tras la incubación, se deja eluir por gravedad la mezcla y se efectúan 2 lavados con PBS 1X seguido de otro con PBS 0.1X.

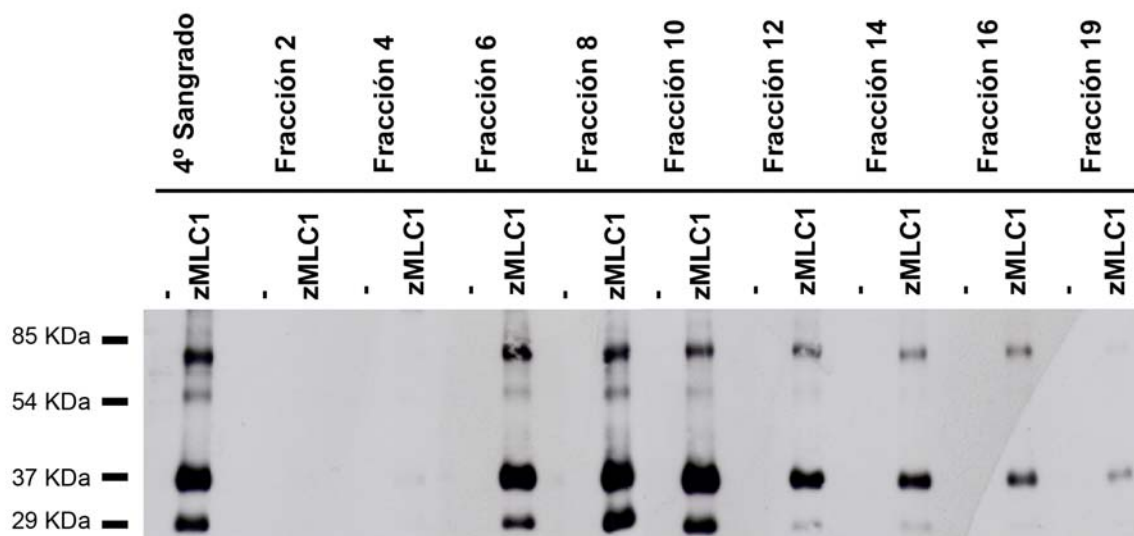
4. La elución de la columna se lleva a cabo mediante la adición de glicina

100 mM pH 2.5. Se colecta el eluido en 20 fracciones de 200  $\mu$ l en tubos *ependorf* donde previamente se han añadido 20  $\mu$ l de solución Tris 1M, NaCl 2M, pH 8.5 (10X), con el fin de neutralizar el pH ácido de la muestra. Por tanto, se van añadiendo 200  $\mu$ l de glicina y se va recolectando cada fracción.

5. Cuando se hayan recolectado todas las fracciones, se lava la columna con solución de lavado, y finalmente con solución de mantenimiento. La columna se guarda con alrededor de 3 ml de dicha solución a 4°C.

Las fracciones fueron diluidas 1/100 en leche al 5% en PBS 1X, y testadas por WB en extractos de células transfectadas con MLC1 de pez cebra. Finalmente, se mezclaron las fracciones con una intensidad de señal mayor.

### PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA zMLC1



**Figura 26: Purificación del anticuerpo contra la región N-terminal de la proteína MLC1 de pez cebra, utilizando el método de afinidad por el péptido.** Western blot donde se prueban el conjunto de fracciones previamente purificadas. Se usa como controles extractos de células HeLa no transfectadas o transfectadas con la proteína zMLC1 (25  $\mu$ g proteína). A partir de la sexta fracción, se detecta la banda correspondiente a zMLC1 con una mayor intensidad (37 Kda). Las fracciones 6, 8, 10, 12, 14 y 16 contienen el anticuerpo contra zMLC1 purificado. Se juntaron las fracciones de la 6 a la 10 y se obtuvo un anticuerpo contra zMLC1 purificado más concentrado. De la 10 a la 16 dieron lugar a otro anticuerpo purificado aunque menos concentrado.

## 2.4 INMUNOCITOQUÍMICA

Durante esta Tesis se han realizado estudios inmunocitoquímicos en células HeLa y en cultivo primario de astrocitos, principalmente para estudiar la localización de las proteínas candidatas del interactoma de MLC1, y para estudiar el comportamiento de MLC1 y CIC-2 solas o conjuntamente con GlialCAM y sus variantes mutadas (tanto en células transfectadas como en cultivo primario de astrocitos). También se han hecho dobles inmunofluorescencias con marcadores de proteínas de uniones en astrocitos.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Cultivo celular en cubre-objetos.
- Placa de cultivo de 24 pocillos.
- Pinzas de cirugía de precisión.
- Porta-objetos.
- PBS 1X estéril.
- Paraformaldehído 3% en PBS 1X.
- Soluciones de autofluorescencia (NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS1X; y Glicina 20 mM en PBS1X).
- Solución de permeabilización (PBS 1X, 0,1% Tritón X-100).
- Solución de bloqueo (PBS 1X, 10% FBS).
- Solución de bloqueo + permeabilización (PBS 1X, 0,1% Tritón X-100, 10% FBS)
- Anticuerpos primarios y secundarios.
- Medio de montaje *Vectashield* (Vector).
- DAPI.

### METODOLOGÍA

1. Se aspira el medio de cultivo y se realizan 2 lavados con PBS.
2. Se fijan las células con paraformaldehído 3% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se lavan las células para eliminar el exceso de paraformaldehído 3 veces con PBS. Si no se realiza la inmunocitoquímica en el momento, se pueden guardar los cubre-objetos fijados a 4°C en PBS 1X pero con 0,05% de azida sódica, para evitar posibles contaminaciones.
4. Se depositan los cubre-objetos en una placa de 24 pocillos con la cara donde se encuentran las células hacia arriba y se les añade PBS. Es muy importante que los cubres no se queden secos.
5. Con el fin de eliminar la autofluorescencia de las células, se incuban los cubres con una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM durante 10 minutos, y seguidamente con una solución de glicina de 20 mM otros 10 minutos más.
6. A continuación se lleva a cabo la permeabilización de las muestras con la solución de permeabilización durante 10 minutos a temperatura ambiente. (\*)
7. Se efectúa el bloqueo con la solución de bloqueo durante 1-2 horas a temperatura ambiente.  
  
(\*) Si la inmunocitoquímica que se quiere hacer no requiere permeabilización, las células se incuban directamente con la solución de bloqueo (sin detergente). Asimismo, si las células han de permeabilizarse, se puede llevar a cabo la permeabilización y el bloqueo conjuntamente con la solución de bloqueo + permeabilización. En algunas ocasiones, en función del anticuerpo se ha procedido a bloquear con BSA en vez de con FBS.
8. Se preparan los anticuerpos primarios a la dilución correspondiente en la solución de bloqueo + permeabilización. Es recomendable centrifugar el



anticuerpo para evitar la agregación de las inmunoglobulinas. Se incuban los cubres con la dilución que contiene el anticuerpo primario depositando 50 µl de la misma sobre un trozo de *parafilm* fijado sobre una superficie plana. Con la ayuda de unas pinzas de precisión, se coloca el cubre sobre la gota, poniendo en contacto las células con la solución de anticuerpo. La incubación puede hacerse durante 1 h a temperatura ambiente o durante 12 h a 4°C colocando los cubres dentro de una cámara húmeda para evitar que la gota pueda evaporarse.

9. Tras la incubación con el anticuerpo primario han de efectuarse lavados. Para ello, se han de pasar los cubre-objetos con cuidado de no romperlos a la placa de 24, con las células mirando hacia arriba. Si la incubación con el anticuerpo primario se ha llevado a cabo durante 12 h a 4°C, los cubres han de atemperarse durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de proceder a los lavados. Se efectúan 3 lavados de 10 minutos con solución de bloqueo + permeabilización, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo.

10. Se prepara el anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo en la solución de bloqueo + permeabilización a una dilución 1/500. A partir de este momento, se mantienen siempre las muestras protegidas de la luz. Se lleva a cabo una incubación de 2 horas a temperatura ambiente.

11. Se realiza 1 lavado con solución de permeabilización y luego otros 3 con PBS 1X de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

12. Se procede a montar el cubre-objeto sobre un porta-objeto de vidrio, al cual se le añade una gota del medio de montaje *Vectashield*, generalmente con DAPI (1,5 µg/ml), el cual emite en el UV. Este momento vuelve a requerir precisión, puesto que las células han de quedar en contacto con el medio. El

porta-objeto se deja secar durante 5 minutos tapado de la luz y se seca el exceso de medio. Finalmente se procede a sellar el cubre. Los portas se guardan en la nevera a 4°C protegidos de la luz.

## **2.5 INMUNOFLUORESCENCIA WHOLE-MOUNT SOBRE EMBRIONES DE PEZ CEBRA.**

Durante este trabajo se han llevado a cabo inmunofluorescencias *whole mount* en distintos estadios embrionarios del pez cebra: desde 24 horas post-fertilización hasta 2, 3, 4, 5 y 6 días, para intentar describir el patrón de expresión de la proteína MLC1 de pez cebra. Asimismo, también se han hecho dobles inmunofluorescencias usando otro marcador, la  $\beta$ -Tubulina acetilada. Cabe señalar que se han realizado dos protocolos diferentes, uno de manera general, y el otro para intentar aumentar la permeabilización y la especificidad del anticuerpo.

- El protocolo que se llevó a cabo de manera general es el siguiente:

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Porta-objetos.
- Cubre-objetos.
- PBS 1X.
- Tween.
- Paraformaldehído (PFA) al 4% en PBST.
- Metanol.
- Proteinasa K.
- Solución de bloqueo (PBST 0,2%, 10% BSA, 1% DMSO).
- Anticuerpos primarios y secundarios.

- Medio de montaje *Vectashield (Vector)*.

### METODOLOGÍA

Normalmente se usan *ependorf* de 2 ml, y para la fijación, el bloqueo y los lavados el volumen que se añade es alrededor de 1,5 - 2 ml. En cambio, los tratamientos especiales, como el de la proteinasa K o la incubación con el anticuerpo 1º o 2º se realizan con menos volumen, alrededor de 500 µl.

1. Los peces son fijados en paraformaldehído al 4% (en PBS 1X, 1% Tween) durante toda la noche a 4°C.
2. Al día siguiente se elimina con cuidado el fijador y se hacen 4 lavados de 10 minutos cada uno en PBST 0,1% (en agitación suave).
3. Si no se utilizan los peces en el momento, se han de deshidratar con metanol. Por tanto, se van haciendo lavados de 5 minutos cada uno en metanol al 25%, al 50%, al 75% hasta el 100% (en PBST 0,1%). Una vez los peces están en metanol 100% se pueden guardar a -20°C. No obstante, se usen o no los peces en el momento, es recomendable hacer siempre el paso de la deshidratación, pues esto ayuda luego a una mejor permeabilización.
4. Para llevar a cabo el protocolo de inmunofluorescencia, los peces se han de volver a hidratar. Por tanto, se han de hacer nuevamente lavados de 5 minutos cada uno en metanol al 75%, al 50%, al 25% hasta llegar a PBST al 0,1%.
5. Se lleva a cabo un tratamiento con proteinasa K a 10 µg/ml en PBST 0,1% para permeabilizar los peces. Si los peces son de día 1, el tratamiento se lleva a cabo durante 5 minutos. Si son de día 2, durante 10 minutos. Y si son de día 3 o mayores, de 15 minutos. Se lleva a cabo sin agitación a temperatura ambiente.

6. Se elimina la solución y se lava con PBST 0,1% durante 5 minutos (de nuevo en agitación).
7. Se vuelven a fijar los peces con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos.
8. Se hacen 3 - 4 lavados con PBST 0,1% de 5 minutos cada uno para eliminar el exceso de PFA.
9. Se incuban los peces durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo.
10. Se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo primario (diluido en solución de bloqueo) a 4°C durante toda la noche (en agitación). La dilución del anticuerpo contra zMLC1 usada es de 1/100, mientras que la de anti  $\beta$ -Tubulina acetilada era 1/1000.
11. Al día siguiente se hacen lavados para eliminar el posible anticuerpo que haya podido quedar sobre la superficie del animal. El número de lavados y su tiempo varía, pero son muy importantes. Se pueden hacer 6 lavados de entre 15 - 30 minutos cada uno con PBST 0,2%, y siempre en agitación.
12. Antes de proceder a incubar con el anticuerpo 2º, se lleva a cabo una incubación de 1 h con solución de bloqueo.
13. Se incuba con el anticuerpo 2º diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (en agitación).
14. Al día siguiente se proceden a hacer los lavados del anticuerpo 2º. Se llevan a cabo entre 5 - 6 lavados con PBST 0,2% de 30 minutos cada uno, y en agitación.
15. Se procede al montaje de los peces en un portaobjetos, colocando pequeñas tiras de celo para hacer un pequeño espacio a la hora de colocar el

cubre-objetos y no aplastar totalmente al pez.

● El otro protocolo que se probó para intentar aumentar el grado de permeabilización del animal para intentar que el anticuerpo pudiera profundizar más fue el siguiente:

#### MATERIALES Y REACTIVOS

- Porta-objetos.
- Cubre-objetos.
- PBS 1X.
- Tritón X-100.
- Paraformaldehído (PFA) al 4%.
- Metanol.
- Proteinasa K.
- Agua miliQ.
- Acetona.
- Solución PTD (PBS 1X, 0,3% Tritón X-100, 1% DMSO).
- Solución de bloqueo PTDBN (PTD, 2mg/ml BSA, 2% NGS).
- Anticuerpos primarios y secundarios.
- Medio de montaje *Vectashield (Vector)*.

#### METODOLOGÍA

1. Fijar los peces en PFA al 4% durante la noche a 4°C.
2. Lavar 2 veces con PBST al 01% durante 5 minutos y deshidratar hasta llegar a metanol 100% (como se explicó en el protocolo anterior), y guardar a -20°C toda la noche.
3. Rehidratar los animales hasta llegar a PBST 0,1% (como se explicó anteriormente).

4. Digerir con proteinasa K 50 µg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente para peces mayores de 3 días.
5. Lavar con PBST 0,1% un par de veces durante 5 minutos.
6. Post-fijar con PFA 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar con PBST 0,1% 5 veces durante 5 minutos cada uno.
8. Lavar en agua para aumentar la permeabilidad: 10 minutos para peces de 24 horas, 1 hora para peces de 48 - 72 horas o más.
9. Lavar varias veces en acetona y congelar a -20°C para incrementar la permeabilidad (7 minutos para peces de 24 horas, y 1 h para peces mayores).
10. Lavar 2 veces en agua (5 minutos cada uno).
11. Lavar en PTD varias veces (3 x 5 minutos).
12. Bloquear en solución de bloqueo (PTDBN) durante 1 h a temperatura ambiente.
13. Incubar con el anticuerpo 1º diluido en PTDBN a 4°C durante toda la noche.
14. Al día siguiente, lavar con PTD 6 x 15 minutos.
15. Incubar con solución de bloqueo (PTDBN) durante 1 h a temperatura ambiente.
16. Incubar con el anticuerpo 2º diluido en PTDBN durante toda la noche a 4°C.
17. Lavar con PTD 6 x 15 minutos.
18. Montaje.

## 2.6 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

Se trata de una técnica que permite precipitar una proteína (antígeno) de manera específica utilizando un anticuerpo. Este anticuerpo se puede unir, bien directamente a una resina de acrilamida o sefarosa, o bien, indirectamente a bolitas que contienen proteína A o G, que reconocen la cadena pesada del nuestro. Además, en los estudios de co-inmunoprecipitación, es posible ver no sólo la proteína de interés, sino también proteínas que interactúan con ella, que han sido también arrastradas por el anticuerpo. En este trabajo se han realizado las dos variantes de la técnica, y se han realizado experimentos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos celulares así como de tejido.

### 2.6.1 Solubilización de las muestras.

Para que la muestra pueda ser inmunoprecipitada, ésta debe estar en estado soluble. La solubilización que se ha llevado a cabo en los experimentos de inmunoprecipitación ha sido no desnaturizante, utilizando detergentes que en principio, no rompen interacciones. Los detergentes que se han utilizado comúnmente han sido Tritón X-100 (1%) y *Complexyolite 47a* (cuya composición desconocemos porque es propiedad de la empresa Logopharm). Se ha de tener en cuenta que el proceso de solubilización de la muestra se ha de hacer el mismo día que la inmunoprecipitación, ya que al trabajar con proteínas de membranas, éstas son más sensibles y tienden a agregarse durante el proceso de congelación.

### 2.6.2 Preparación de la proteína A sefarosa.

Se pesan 0,5 g de proteína A sefarosa y se añaden 7,5 ml de agua destilada en un tubo de 15 ml. Se mezclan bien y se centrifuga durante 1

minuto a 1000 rpm. Se aspira el sobrenadante y se vuelve a añadir agua hasta 7,5 ml. Se vuelve a mezclar y se centrifuga en las mismas condiciones. Se repite el proceso anterior unas 5 veces. Tras el último lavado se añade agua con 0,02% de azida sódica hasta 7,5 ml. Se guarda en la nevera a 4°C en posición vertical.

### **2.6.3 Inmunoprecipitación clásica con proteína A sefarosa.**

Con esta técnica se van a hacer ensayos de inmunoprecipitación con extractos proteicos solubles de células transfectadas, así como de tejido (cerebro de rata y ratón) utilizando diferentes anticuerpos (descritos en el apartado correspondiente de resultados).

Es indispensable realizar un control negativo para descartar la precipitación inespecífica con la proteína A sefarosa. Por ello, siempre se procesan dos muestras en paralelo.

1. Se procede a la solubilización de las muestras con el detergente (Tritón o *complexolite 47a*) más los inhibidores de proteasas, y se valora la concentración proteica. Todo el proceso se lleva a cabo a 4°C.
2. En función de la concentración proteica que tenga nuestro extracto solubilizado, elegimos entre 150 - 350 µg de proteína para llevar a cabo la inmunoprecipitación. Generalmente, para trabajar con los mismos volúmenes, llevamos las muestras a un volumen final determinado (con el mismo tampón de solubilización), de modo que tengamos nuestra muestra entre 1 y 1,5 µg/µl.
3. A la fracción soluble elegida para realizar la inmunoprecipitación se le añade el anticuerpo en cuestión (generalmente 50 µl si es uno de los anticuerpos policlonales producidos por nuestro grupo, o entre 15 - 25 µl si es un anticuerpo monoclonal como el anti-HA o anti-Flag, lo cual dependerá de la



concentración proteica del extracto que se quiere inmunoprecipitar). En el caso de la muestra control negativo, no se le añade anticuerpo, se le añade tampón de solubilización. Es importante dejar siempre una alícuota del extracto total. Las muestras se incuban durante 2 h a 4°C en un orbital (y selladas con el fin de que no se pierda muestra ni anticuerpo).

4. Durante este tiempo se procede a preparar y equilibrar las bolitas de proteína A sefarosa. La cantidad de proteína A elegida para hacer la inmunoprecipitación depende de la cantidad proteica del extracto a inmunoprecipitar así como de la cantidad de anticuerpo unido. Es recomendable hacer una titulación para optimizar la IP, pues a veces puede ocurrir que no seamos capaces de inmunoprecipitar el 100%. En ese caso, podríamos bien aumentar la cantidad de bolas, bien disminuir la cantidad proteica del extracto a inmunoprecipitar o bien aumentar la cantidad de anticuerpo. Durante este trabajo se han usado generalmente entre 40 y 75  $\mu$ l de bolitas de proteína A sefarosa. Estas bolitas han de equilibrarse con el tampón de solubilización antes de ser puestas en contacto con el extracto. Para ello, se lavan varias veces (5 veces) con dicho tampón. Es muy importante que nunca queden secas.

5. Tras la incubación de las muestras con el anticuerpo durante 2 horas, se procede a poner en contacto dichas muestras con las bolitas de proteína A sefarosa previamente equilibradas. Se lleva a cabo una incubación entre 3 y 16 horas a 4°C en el orbital.

6. Finalizado el proceso de incubación, se realiza una centrifugación que permite separar la proteína A sefarosa de la fracción soluble proteica. Nos quedamos con el sobrenadante que guardamos en un nuevo tubo, el cual debe

ser rotulado como “sobrenadante” o “fracción no unida”. Y tendremos siempre el de nuestra muestra problema como el del control negativo al cual no se le añadió anticuerpo.

7. El *pellet* obtenido (que son las bolas de sefarosa más las proteínas que han quedado unidas a dichas bolas) es lavado 4 - 5 veces con el mismo tampón de solubilización. Posteriormente, para eluir las proteínas que están unidas a las bolitas de sefarosa se añade el tampón de carga *Laemmli* (LSB 1X) + 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y se calientan las muestras a 60°C durante 15 minutos, con el fin de romper las uniones del anticuerpo con la resina y del anticuerpo con el antígeno. La cantidad de LSB 1X varía, pues depende de la concentración proteica del extracto que se eligió para inmunoprecipitar, pues si se pone mucha cantidad, la muestra puede quedar diluida. Lo que generalmente se ha hecho es eluir con el mismo volumen final con el que se decidió comenzar la inmunoprecipitación, así las muestras pueden ser comparables.

8. Tras la incubación a 60°C, se lleva a cabo una centrifugación, obteniéndose en el sobrenadante el eluido de la inmunoprecipitación. Éste se recoge en un nuevo tubo y se rotula como “*pellet*” o “fracción unida”. En este caso, volvemos a tener nuestra muestra problema y la del control negativo.

La inmunoprecipitación se analiza por WB, inmunodetectando con anticuerpos contra la proteína inmunoprecipitada así como con anticuerpos contra proteínas que interaccionan con ella. Se cargan 50  $\mu$ g de proteína, tanto del extracto total, como del sobrenadante y del *pellet*, de modo que las muestras puedan compararse. La inmunoprecipitación es positiva cuando se detecta la proteína inmunoprecipitada en el eluido positivo y no en el negativo.

Es importante destacar que a la hora de llevar a cabo la inmunodetección en el WB es útil utilizar otro anticuerpo diferente al que ha sido utilizado para llevar a cabo la inmunoprecipitación, ya que si no, las inmunoglobulinas serán detectadas, impidiendo en muchos casos, la correcta visualización de las proteínas de interés.

Este tipo de inmunoprecipitación también se ha llevado a cabo mediante el uso de bolas magnéticas con proteína A sefarosa y un soporte magnético de *Millipore (PureProteome Protein A beads.)*. En este caso la inmunoprecipitación puede llevarse a cabo en menos tiempo y es algo más limpia, ya que no hay contaminación de la muestra con las bolas, ya que éstas quedan enganchadas con el imán, siendo capaz de recoger el sobrenadante sin llevarse ninguna bolita (se han seguido las instrucciones del fabricante).

#### **2.6.4 Inmunoprecipitación con el sistema *Aminolink Plus Immobilization Kit (Pierce 44894 20394)*.**

Este sistema permite la inmovilización eficiente de péptidos o proteínas a un soporte sólido presente en una columna de afinidad. La unión covalente de péptidos o anticuerpos permiten la inmunopurificación por afinidad proteica. Este sistema por tanto, permite el uso del mismo anticuerpo para inmunoprecipitar y para su posterior detección por WB. Asimismo, permite ser reutilizado. La matriz está formada por un 4% de agarosa entrecruzada, activada por grupos funcionales aldehídos. Las aminos primarias reaccionan con estos grupos funcionales reduciéndose para formar una amina secundaria que queda covalentemente unida a la matriz. El sistema permite dos protocolos diferentes variando el pH del tampón de acoplamiento para proteínas sensibles

al pH.

En este trabajo se han preparado 2 columnas diferentes, donde se ha procedido a la unión del anticuerpo contra el péptido C2 de CIC-2 y de la BSA (albúmina sérica bovina), como un control negativo. Asimismo, se ha usado también la columna con el anticuerpo anti-MLC1 (péptido N4 humano) unido (ya presente en el grupo).

● Montaje de las columnas (según el protocolo del proveedor).

Previamente al montaje de las columnas, el anticuerpo contra CIC-2 (C2) y la BSA van a ser dializadas en tampón de acoplamiento pH 10, obteniendo 2-3 ml a una concentración de 1-2 mg/ml. Se siguieron las indicaciones del fabricante utilizando el procedimiento a pH 10. Se va a conseguir una eficiencia de acoplamiento del anticuerpo de alrededor del 55%. En el caso de la BSA fue del 75%.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Columna *AminoLink*.
- Tampón de acoplamiento (PBS, pH 10).
- PBS, pH 7,2.
- Tampón de citrato-carbonato (0,1 M citrato sódico, 0,05 M carbonato sódico, pH 10).
- Tampón de amortiguación (1 M Tris-HCl, 0.05% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4).
- Tampón de lavado (1 M NaCl, 0.05% NaN<sub>3</sub>).
- Tampón de conservación (PBS, 0.05% NaN<sub>3</sub>).
- Cianoborohidruro de sodio (NaCNBH<sub>3</sub>, 5 M).
- Proteína (2 ml en 2 ml del tampón de unión).

METODOLOGÍA

1. Se deja atemperar la columna que contiene la agarosa a temperatura ambiente y se deja drenar la solución.
2. Se equilibra la agarosa con 5 ml de tampón de acoplamiento y se deja drenar.
3. Se añaden los 4ml de la proteína diluida con el tampón de acoplamiento, guardando antes una pequeña alícuota. Se incuba la mezcla en la columna durante 4 h en un orbital a temperatura ambiente.
4. Se deja drenar el líquido y se guarda otra alícuota.
5. Se lava la columna 2 veces con 5 ml de PBS pH 7,2.
6. Se añaden 2 ml de PBS pH 7,2 más 40  $\mu$ l de NaCNBH<sub>3</sub>, se tapa y se deja reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente o 16 h a 4°C.
7. Se deja drenar el líquido y se lava con 4ml de tampón de amortiguación.
8. Se añaden 2 ml de tampón de amortiguación más 40  $\mu$ l de NaCNBH<sub>3</sub>, y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en el orbital.
9. Nuevamente se deja drenar y se lava la columna 4 veces con 4ml de la solución de lavado. Finalmente, se hacen 2 lavados con 4 ml de la solución de conservación para equilibrar la columna, y se guarda bien tapada con 2 ml del mismo tampón a 4°C.

Se valora la proteína de la alícuota inicial y de la alícuota no unida para saber qué porcentaje de unión a la agarosa se ha obtenido (la concentración del anticuerpo no unido debería ser mucho menor que la concentración inicial, ya que el anticuerpo debe estar acoplado a las bolitas).

● Protocolo general de inmunoprecipitación por afinidad.

A) Purificación de anticuerpos por afinidad.

Es el mismo protocolo descrito en el apartado 2.3.1. En este trabajo se

ha purificado el anticuerpo contra la proteína zMLC1 con la columna a la que previamente se le unió el péptido contra el cual estaba diseñado el anticuerpo (resultados capítulo 3).

#### B) Co-Inmunoprecipitación en *batch*.

Este procedimiento es similar al descrito en el apartado 2.5.2 con algunas modificaciones, pues para realizar las inmunoprecipitaciones se utiliza la agarosa que presenta los anticuerpos unidos covalentemente (en el apartado anterior los anticuerpos no estaban unidos covalentemente a las bolitas).

Se debe realizar un control previo para establecer la relación proteína-resina con la que obtenemos un máximo de proteína inmunoprecipitada. Una vez establecida dicha relación, se procede a realizar las inmunoprecipitaciones. En este caso, los extractos solubilizados se ponen en contacto con la cantidad de agarosa/anticuerpo que corresponde y se incuban durante 3 – 12 h a 4°C. Posteriormente se procede a la obtención de los sobrenadantes (o fracción no unida) y de los *pellets* (o fracción sí unida) de la misma manera que en el apartado 2.5.2. Los resultados son visualizados mediante WB, de modo que en los *pellets* específicos se encuentra la proteína inmunoprecipitada, mientras que en las muestras con bolitas con BSA, la proteína se encuentra en el sobrenadante.

### **2.7 TRATAMIENTO CON ENDO-F Y ENDO-H.**

● La endoglicosilasa F es una enzima que corta el enlace entre el primer y el segundo residuo de la cadena de carbohidratos (*N*-acetilglucosamina), y eso permite ver si una proteína presenta o no glúcidos.

● La endoglicosidasa H es una enzima altamente específica, capaz de cortar oligosacáridos ricos en manosas unidas a asparagina, pero no oligosacáridos complejos altamente procesados. Una proteína sensible a EndoH indica que no ha sido procesada en el Aparato de Golgi y que se encuentra en el RE.

### REACTIVOS

- Extracto de células HeLa transfectadas.
- Tampón desnaturizante 10X.
- Agua.
- Tampón G7 10X.
- NP40.
- Tampón G5 10X.
- Endoglicosilasa F y Endoglicosilasa H.

### METODOLOGÍA

La reacción típica que se llevó a cabo fue la siguiente:

extracto proteico	30-40µg	} 15 minutos a 60°C.
Tampón desnaturizante 10x	2 µl	
Agua	Hasta volumen final: 20µl	

● En el caso del tratamiento con Endo F se añade:

Tampón G7 10X	3 µl	} Toda la noche a 37°C.
NP40	3 µl	
Endo F	2 µl	
Agua	2 µl	

- En el caso del tratamiento con Endo H se añade:

Tampón G5 10X	3 $\mu$ l	} Toda la noche a 37°C.
Endo H	4 $\mu$ l	
Agua	3 $\mu$ l	

Al día siguiente las muestras pueden ser procesadas por WB. Hay que tener en cuenta que la cantidad de proteína que se va a analizar por WB es de 30 - 40  $\mu$ g, y está en un volumen total de 30  $\mu$ l. Para preparar la muestra con el tampón de carga, hay que añadirle 10  $\mu$ l de LSB4x.

## 2.8 ELISA

Durante esta Tesis se han llevado a cabo varios experimentos usando la técnica de ELISA. Uno de ellos fue la purificación de un anticuerpo contra el péptido C2 de la proteína CIC-2, el cual no pudo purificarse por WB, ya que no se conseguía detectar bien la proteína. Es por ello que se optó por probar las diferentes fracciones obtenidas purificadas por ELISA, y luego juntar aquellas que habían dado un título más alto por dicha técnica.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Placas de 96 pocillos EIA/RIA (*Costar*).
- Lector de ELISA (*BioTec*).
- Péptido o proteína o anticuerpo de captura.
- PBS 1x estéril.
- Solución de bloqueo (PBS 1X, 2% BSA).
- Solución de lavado (PBS 1X, 1% Tween20).
- Anticuerpos primarios y secundarios.



- Reactivo de revelado: OPD (*Sigma*). Se prepara en un tubo de 50 ml con 20 ml de agua miliQ estéril, y se añade 1 pastilla grande y otra pequeña de las que viene en el *kit* comercial. Se mezcla bien hasta que se disuelve y se protege de la luz.

### METODOLOGÍA

1. Se sensibilizan placas de 96 pocillos especiales para ELISA con el péptido de captura, a razón de 100  $\mu$ l por pocillo, y a una concentración de 3  $\mu$ g/ml en PBS 1X estéril. La placa se incuba durante toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda, para evitar que el péptido pueda secarse.
2. Se descarta la solución y se hacen 2 lavados con 200  $\mu$ l/pocillo con PBS 1X.
3. Se bloquea la placa con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS 1X, 2% BSA. La placa se incuba durante 1 h a 37°C.
4. En este punto, se preparan las diluciones de los anticuerpos que se vayan a utilizar, teniendo en cuenta que el volumen final que se va a aplicar por pocillo es de 100  $\mu$ l, y que el anticuerpo se diluye en la solución de bloqueo.
5. Se descarta la solución de bloqueo y se lava la placa con PBST (200  $\mu$ l/pocillo).
6. Se añaden los 100  $\mu$ l del anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora protegido de la luz, a temperatura ambiente. Es importante añadir un control negativo (100  $\mu$ l de solución de bloqueo solo) y un control positivo si se dispone.
7. Se realizan 4 lavados con PBST con 200  $\mu$ l/pocillo.

8. Se añaden 100  $\mu$ l/pocillo del anticuerpo secundario, diluido 1/3000 en solución de bloqueo; y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz.
9. Se descarta la solución y se hacen 3 lavados con PBST seguidos de 2 lavados con PBS 1X (200  $\mu$ l/pocillo).
10. Se añaden 100  $\mu$ l/pocillo de la solución de revelado (OPD). Se incuba durante 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se recomienda ir observando la placa para evitar que aumente mucho el fondo o *background*.
11. Se lee la placa a 450 nm con el lector de ELISA.

## **2.9 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR LUMINISCENCIA.**

Esta metodología se basa en la detección inmunológica de proteínas endógenas o transfectadas en la superficie de la membrana celular (Margeta-Mitrovic, 2002). Durante esta Tesis se ha llevado a cabo la medida de la expresión en superficie de la proteína quimérica MLC1GLYC, de las proteínas MLC1 y CIC-2 humanas, tanto solas como con GlialCAM en células HeLa transfectadas; y de MLC1 así como un mutante de MLC1 (P92S) en cultivo primario de astrocitos transduciéndolos con adenovirus. Tanto la proteína MLC1, como CIC-2, la proteína quimérica MLC1GLYC y el mutante P92S, contenían un epítipo *HA* en uno de sus lazos extracelulares. El epítipo *HA* extracelular es detectado mediante una reacción inmunocitoquímica por un anticuerpo (3F10 rat anti-*HA*), al que se unía específicamente un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente se adicionaba el

reactivo *Power Signal Elisa* (Pierce), el cual produce una reacción quimioluminiscente con la HRP del complejo, que era cuantificada por un luminómetro, a partir del cual se obtenía un valor relativo correspondiente a la cantidad de proteína detectada en la membrana plasmática.

#### MATERIALES Y REACTIVOS

- Luminómetro TD-20/20 (*Turner BioSystems*).
- Placas de cultivos de 10 cm de diámetro.
- Placas de cultivo de 35 mm de diámetro.
- Células HeLa transfectadas.
- Astrocitos primarios infectados.
- Paraformaldehído al 3% en PBS 1X.
- PBS 1X.
- Solución de bloqueo (PBS 1X, 1% BSA).
- Anticuerpo primario (3F10 Rat anti-HA, *Roche*).
- Anticuerpo secundario (goat anti-rat-HRP , *Jackson ImmunoResearch*).
- Solución *Power Signal Elisa* (Pierce).
- Solución de lisis (NaOH 200µM, 1% SDS).

#### METODOLOGÍA

Antes de comenzar, se deben tener en cuenta las siguientes observaciones:

- 1) Las células se transfectan en placa de 10 cm de diámetro, y a las 24 horas son transferidas a placas de Petri de 35 mm de diámetro, cuyo tamaño se adapta al receptáculo del luminómetro destinado a la muestra.
- 2) Se hacen 4 réplicas para cada punto o muestra.

- 3) La aplicación de los reactivos se efectúa placa por placa, siempre en el mismo orden, de modo que el tiempo de reacción para cada placa sea siempre el mismo.
- 4) El volumen de los reactivos aplicados es, en todos los pasos, de 1 ml.
- 5) Es muy importante efectuar todos los lavados que requiere el protocolo, con el fin de evitar ruido de fondo, que en esta técnica tiende a ser elevado.
- 6) Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

Así, el protocolo seguido es el siguiente:

1. Se lavan las células con PBS 1X y se fijan con paraformaldehído al 3%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se efectúan 3 lavados seguidos con PBS 1X.
2. Seguidamente, se incuban en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente (no se lleva a cabo permeabilización, ya que queremos detectar la presencia de la proteína en la membrana plasmática).
3. Tras el bloqueo, las células son incubadas durante 1 hora con el anticuerpo 3F10 Rat anti-HA (*Roche*) a una concentración de 0,2 µg/ml en solución de bloqueo (una dilución 1/500).
4. Seguidamente, se efectúan 3 lavados seguidos en solución de bloqueo, seguidos de otros 3 lavados de 15 minutos cada uno, también en solución de bloqueo.
5. Tras los lavados, se incuban las células con anticuerpo secundario goat anti-rat-HRP, (*Jackson ImmunoResearch*), diluido 1:1000 en solución de bloqueo, durante 20 minutos. Es muy importante que el tiempo de incubación no exceda de esos 20 minutos.
6. Posteriormente, se llevan a cabo 4 lavados seguidos en solución de

bloqueo (el último de 15 minutos), y después, 4 lavados seguidos con PBS 1X para terminar finalmente con 4-5 lavados de 15 minutos cada uno con PBS 1X (los últimos 2 lavados pueden excederse de los 15 minutos, de hecho, es recomendable).

7. El revelado se efectúa mezclando la solución A y la solución B del reactivo *Power Signal Elisa (Pierce)* en una proporción 1/1 v/v, siendo el volumen que se le aplica a cada placa de 500  $\mu$ l. El reactivo es añadido directamente sobre la placa y rápidamente, se mide la quimioluminiscencia en el luminómetro TD-20/20 previamente calibrado. La calibración se lleva a cabo ajustando la sensibilidad con la muestra que creemos que será la más positiva de todas, ya que el luminómetro tiene una sensibilidad máxima, y debemos ajustar la sensibilidad de nuestro experimento para no superar el rango en el que el aparato puede medir.

8. Para normalizar los valores relativos obtenidos, se lleva a cabo una corrección por la proteína total. Por tanto, una vez medidas todas las placas, se lavan con PBS 1X y se añade solución de lisis (300  $\mu$ l). Las muestras son resuspendidas y la concentración de proteínas es determinada por el método de BCA.

## **2.10 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Una estrategia alternativa para detectar la proteína MLC1 en la membrana plasmática fue la inmuno-detección de ésta a través de técnicas de citometría de flujo. También se llevó a cabo esta técnica para medir si la expresión de GlialCAM en la membrana de astrocitos de rata aumentaba

cuando se aplicaba una solución con alto contenido en potasio (gracias al uso de un anticuerpo que reconoce la parte extracelular de GlialCAM).

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Células HeLa sin transfectar y transfectadas con el cDNA *MLC1* humano, conteniendo 1 epítipo HA extracelular.
- Astrocitos primarios de rata (con medio fisiológico o con alto contenido en potasio).
- Tripsina.
- Solución de bloqueo (0.2% FBS en PBS 1X).
- Anticuerpo primario (3F10 Rat anti-HA, *Roche*); anti GlialCAM (monoclonal de *R&D Systems*).
- Anticuerpo secundario (anti-rat marcado con ficoeritrina, *Jackson ImmunoResearch*); (anti-mouse Alexa 488, *Molecular Probes*).

### METODOLOGÍA

1. Células HeLa sin transfectar y transfectadas con *MLC1* conteniendo un epítipo HA extracelular fueron tripsinizadas (ver apartado 3.1.2) y centrifugadas durante 1 minuto a 5100 rpm. Lo mismo en el caso de los astrocitos de rata.
2. Tras eliminar los sobrenadantes, los *pellets* fueron resuspendidos en 1 ml de solución de bloqueo, y se procedía a hacer una centrifugación a 13000 rpm durante 30 segundos a 4°C.
3. Los *pellets* fueron entonces resuspendidos en 100 µl de solución de bloqueo conteniendo una dilución 1/20 de los anticuerpos primarios (3F10 Rat anti-HA o anti GlialCAM), y la mezcla fue incubada a 4°C durante 30 minutos.
3. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 30

segundos a 4°C, se aspiraron los sobrenadantes y se resuspendieron los *pellets* en 1 ml de solución de bloqueo (0.2% FBS en PBS 1X).

4. Tras una nueva centrifugación llevada a cabo en las mismas condiciones que la anterior, los *pellets* fueron resuspendidos en 100 µl de solución de bloqueo conteniendo una dilución 1/20 de anticuerpo secundario (anti-rat marcado con ficoeritrina o anti-mouse Alexa 488). Dichas muestras fueron incubadas durante 30 minutos a una temperatura de 4°C.

5. Las muestras se centrifugaron de nuevo durante 30 segundos a 4°C y los *pellets* se resuspendieron en 1 ml de solución de bloqueo.

6. Posteriormente, se efectuó una última centrifugación en las mismas condiciones que las anteriores, y una última resuspensión en 0,5 ml de la misma solución de bloqueo.

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FACS), donde el control negativo correspondía a células HeLa sin transfectar o astrocitos donde solo se añadió el anticuerpo 2º, y no ofrecían señal alguna. En cambio, las células transfectadas con el cDNA *MLC1* humano conteniendo el epítipo HA extracelular, sí expresaban la proteína en superficie, siendo positivas a la ficoeritrina. Se podía cuantificar qué cantidad de proteína era capaz de llegar a la membrana plasmática en comparación con las células no transfectadas. En el caso de los astrocitos se pudo comparar la expresión de GlialCAM en la superficie de la membrana celular de los astrocitos, bien en condiciones fisiológicas como en condiciones de un medio rico en potasio.

### **3. CULTIVOS CELULARES.**

La manipulación de células en cultivo implica trabajar con unas condiciones de máxima limpieza, higiene y esterilidad, pues cualquier pequeña

contaminación, sea de origen fúngica o bacteriana, comprometerá el experimento que se esté llevando a cabo. Se ha de trabajar siempre bajo una campana de flujo vertical. Antes de comenzar a trabajar, se deben lavar las manos con jabón y seguidamente con etanol 70%. El material fungible que se utilice debe ser estéril, y se ha de abrir bajo la campana. Los medios de cultivo y soluciones que van a estar en contacto con las células, deben ser estériles (autoclavados, filtrados, irradiados, etc) y es conveniente atemperarlos a 37°C en un baño, así como posteriormente rociarlos con etanol al 70% antes de ser utilizados. También han de abrirse solamente bajo la campana. Tanto antes como después de su uso, la campana debe limpiarse con etanol al 70% y encender la luz U.V. durante 10 minutos, antes de comenzar.

### **3.1 LÍNEAS CELULARES.**

En este trabajo se han utilizado principalmente 2 líneas celulares: células HeLa y células HEK293. La línea celular HeLa procede de adenocarcinoma de cerviz humano, caracterizada por presentar un fenotipo epitelial y por tener incorporadas secuencias del papilomavirus humano (HPV-18). La línea HEK deriva de células epiteliales de riñón humano, y está transformada con el gen E1A de adenovirus (Graham et al., 1977). La línea 293T, concretamente, consiste en un derivado de la línea 293, que expresa, además, el antígeno T del SV40, que permite la replicación episomal de plásmidos que contengan un origen y una región promotora temprana de SV40 (Alwine, 1985).

#### **3.1.1 Condiciones generales de cultivo para células HeLa y HEK293.**

Las condiciones de cultivo para células HeLa o HEK293 son a 37°C,



90% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo para células adherentes es el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Biological Industries*) sin suplementar que se guarda en la nevera a 4°C. La suplementación consiste en añadir sustancias como glutamina, antibióticos, o suero fetal bovino (FBS), que se mantienen a -20°C. Los antibióticos utilizados rutinariamente han sido la penicilina, que inhibe la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana, y la estreptomycinina, que inhibe la síntesis del ribosoma 70S bacteriano. El FBS se ha sometido a un tratamiento previo de inactivación del complemento y anticuerpos, a 56°C durante 25 minutos. Regularmente se realizan pruebas para comprobar la ausencia de contaminación por micoplasma. El medio se cambia cada tres días y se hace un seguimiento del crecimiento del cultivo de manera que cuando se está cerca de la máxima confluencia se tripsiniza y se vuelve a sembrar el cultivo más diluido.

### **3.1.2 Tripsinización.**

Tanto las células HeLa como la HEK293 crecen rápidamente, con lo que cuando la placa está confluyente, es decir, cuando la monocapa de células ocupa aproximadamente el 100% de la misma, las células deben despegarse de ésta (para evitar que las células comiencen a morir), mediante un proceso de tripsinización, seguido de un recultivo de las células a una densidad de 5 a 10 veces menor. Para ello, se elimina el medio de cultivo que cubre las células y se efectúan 2 lavados en PBS 1X estéril. Esto es porque los factores presentes en el FBS del medio inhiben la acción de la tripsina. A continuación, se añade la tripsina (Tripsina-EDTA 1X, *Biological Industries*). El volumen a añadir varía dependiendo del tamaño de la placa de cultivo (por ejemplo, 200 µl por pocillo en placas de 6 pocillos, 1 ml en placas de 10 cm de diámetro, 2 ml

en flascos de 75 cm<sup>2</sup>, etc). La tripsina se incuba durante 5 minutos a 37°C en el incubador. La reacción se para cuando se observa en el microscopio que las células se han desenganchado y disgregado de la placa, añadiendo medio de cultivo (que contiene FBS, el cual inactivará la tripsina). Las células se resuspenden bien y se pueden contar, así como sembrar o hacer un pase de mantenimiento, que generalmente se realiza a una dilución 1:10.

### **3.1.3 Congelación de células.**

Las células eucariotas son capaces de soportar procesos de congelación cuando éstos se dan de forma gradual y con la presencia de un agente crioprotector que evita la formación de cristales de agua que puedan romper la célula. Una vez las células se han tripsinizado, éstas pueden ser congeladas. Se pasan las células a un tubo y se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* de células con DMEM completo más un 10% de DMSO (1 ml por cada  $2 \times 10^6$  células). Se hacen alícuotas en criotubos (de aproximadamente 1 ml) y utilizando un *cooler*, se proporciona una congelación gradual. Los criotubos se depositan en el congelador de -80°C entre 10 y 16 horas, y una vez congeladas, se depositan en nitrógeno líquido a -190 °C.

### **3.1.4 Descongelación de células.**

La descongelación debe efectuarse de manera rápida (al contrario que el proceso de congelación), con el fin de eliminar el DMSO del medio, el cual es tóxico para las células. Para ello, se incuban las células del criotubo a 37°C y una vez descongelado, se resuspende el contenido en un tubo *corning* con 10 ml de medio de cultivo atemperado a 37°C. Seguidamente se centrifugan a

baja velocidad (5 minutos a 1000 rpm), se elimina el medio y se resuspenden las células de nuevo en 10 ml de medio, los cuales se plaquean en una placa de Petri y se dejan crecer en el incubador a 37°C.

### **3.2 CULTIVOS PRIMARIOS.**

El motivo por el que se procedió a obtener cultivos primarios de astrocitos se basaba en que se quería trabajar con una línea celular que expresase MLC1 de forma endógena. Anteriormente en el grupo se habían testado un amplio conjunto de líneas celulares con el fin de encontrar alguna donde MLC1 se expresara de forma endógena, pero el resultado fue negativo. El único sistema celular donde MLC1 se expresa endógenamente es en el cultivo primario de astrocitos y en el de neuronas. Es por ello que se decidió realizar cultivos primarios de astrocitos porque lo considerábamos un buen modelo celular para llevar a cabo estudios que nos sirviera para complementar parte de los resultados que obteníamos en células transfectadas, ya que dicho sistema es más parecido a la situación real. Para la obtención de astrocitos primarios puros, se usaron ratas de estadio post-natal entre P0 y P3, y se siguió el protocolo de (McCarthy and de Vellis, 1980) y (Baorto et al., 1992). Asimismo, el protocolo usado estaba aprobado por el comité ético de la Universidad de Barcelona y el Estabulario del campus de Bellvitge.

#### **3.2.1 Obtención de cultivos primarios de astrocitos de rata.**

##### **MATERIALES**

- Ratas de la cepa Sprague-Dawley (Charles River), en estadios P0-P3.
- Material de cirugía (tijeras, pinzas de microcirugía y micropinzas cortantes).

- Placas de Petri de 10 cm y de 35 mm de diámetro.
- Pipetas Pasteur de plástico estériles.
- Pipetas Pasteur de cristal estériles.
- Cubre-objetos estériles pre-tratados con 100 µg/ml de poli-D-lisina.
- Tubos *Corning* estériles de 15 ml y de 50 ml.
- Filtro de 100 µm (*Falcon*).
- Frascos de 25 ml.
- Cámara de Neubauer.
- Lupa binocular (*Nikon*).

### REACTIVOS

- Medio de disección (PBS 1x, 0,3% BSA, 0,6% glucosa), estéril, a 4°C.
- Poli-D-lisina a 100 µg/ml en PBS (*Sigma*).
- Medio de cultivo DMEM (*Biological Industries*) completo (10% FBS, 1% Penicilina /Estreptomina, 1% Glutamina).
- Tripsina-EDTA 1X (*Biological Industries*).
- DNasa I (1000 U/ml en 0,15 M NaCl).
- Ara C (*Sigma*) (4mM).
- dBAMPc (*Sigma*) (250mM).

### Tratamiento de las placas de cultivo y de los cubre-objetos.

Para asegurar la máxima adherencia de los astrocitos en los cubre-objetos de las placas de 24 pocillos, se tratan éstos con poli-D-lisina. Así, se colocan los cubre-objetos estériles en la placa y se añade una solución de poli-D-lisina 100 µg/ml en agua miliQ (alrededor de 200 µl). Se incuban a 37°C desde 1 h hasta toda la noche. Posteriormente, se retira y se hacen 3 lavados con agua miliQ estéril y se dejan secar.

## METODOLOGÍA

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos a partir de corteza e hipocampo de ratas en estadios P0-P3. El proceso de extracción del cerebro y la microdissección se efectúan siempre en frío y en las condiciones de mayor esterilidad posible.

1. Las crías son anestesiadas en hielo, y posteriormente, decapitadas con unas tijeras. Las cabezas son colocadas sobre una placa de Petri. La extracción del cerebro se realiza con ayuda de unas pinzas de microcirugía, así como de unas tijeras. Para ello, se sujeta la cabeza clavando unas pinzas en los ojos, y con unas tijeras, se secciona la epidermis para separar la piel de la cabeza. Se corta el hueso del cráneo por la línea media, tomando la precaución de no dañar el cerebro. Se abren los huesos y se saca el cerebro por debajo con la ayuda de unas pinzas, y se coloca en una nueva placa de Petri con medio de disección frío.
2. La placa con el cerebro se coloca bajo una lupa y primeramente se separa el cerebelo de las cortezas haciendo un corte con las pinzas y asimismo, se separan los dos hemisferios por la línea media. También se extraen los bulbos olfativos.
3. Las cortezas se colocan en posición ventral y con las pinzas se extrae el tálamo y las meninges. Una vez extraído el tálamo, por la parte de debajo de los hemisferios, se pueden observar los hipocampos, con una forma semicircular de media luna.
4. Con la ayuda de unas micropinzas de precisión cortantes, se pueden aislar los hipocampos, accediendo desde la región ventral de los hemisferios. Se depositan en medio de disección nuevo fresco en una placa de Petri.

5. También se han realizado cultivos de corteza junto con hipocampo. En este caso, se procede igual que antes, quitando el tálamo en cada hemisferio con ayuda de unas pinzas, y dejando el hipocampo se procede a retirar completamente las meninges. Cada hemisferio presenta un aspecto cóncavo recubierto únicamente por la corteza cerebral y el hipocampo. Se depositan también en medio nuevo fresco.
6. Seguidamente, y con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico estéril, se transfieren los hipocampos o las muestras de corteza a una placa de Petri de 35 mm de diámetro, la cual contiene 2 ml de tripsina y DNAsa I (1/100) (previamente preparada y equilibrada en el incubador), y se incuban a 37°C durante 10 minutos.
7. Tras la incubación, se traspasan las muestras a un tubo de 50 ml con 5 ml de DMEM completo con DNAsa I (1/100), y se procede a una disgregación mecánica usando cada vez una pipeta de poro más pequeño. Se deja reposar y tras 5 minutos se transfiere el medio completamente disgregado a otro tubo de 50 ml con 5 ml más de medio completo, y se vuelve a homogeneizar con varias Pasteur de poros de diferente tamaño.
8. Se lleva a cabo una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y se resuspende generalmente en 10 ml de DMEM completo (el volumen de medio que se añade depende del tamaño del *pellet* de células obtenido), el cual se pasa por un filtro de 100 µm para evitar agregados.
9. Se procede a la siembra de las células en flascones, a razón de 1 flascón por cada 3 crías de rata, añadiendo medio hasta 10 ml. Se incuban a 37°C.
10. Se cambia el medio al día siguiente, y cada 2-3 días.

### 3.2.2 Purificación del cultivo de astrocitos.

Una vez está sembrado el cultivo, el cual estará formado por células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) se deja crecer entre 7-10 días hasta que esté confluyente. Para eliminar los oligodendrocitos y la microglía y conseguir un cultivo puro de astrocitos, se procede a hacer una agitación mecánica fuerte, ya que los astrocitos son capaces de engancharse muy bien a la superficie plástica de la placa, mientras que el resto de las células no. Para ello, se procede a cambiar el medio de los flacones unas horas antes de dicha agitación y se deja equilibrar en el incubador para que estén a la concentración de CO<sub>2</sub> adecuada. En un incubador a 37°C se ha de instalar un agitador, y en éste se han de colocar los flacones, con el tapón bien cerrado y sellado con *parafilm*. Se procede a una agitación durante toda la noche a 250 rpm a 37°C. Después de este proceso, se obtiene un cultivo primario de astrocitos de rata de aproximadamente un 95% de pureza. Se retira el sobrenadante, se hacen 3 lavados con PBS 1X estéril y se tripsinizan los astrocitos. Finalmente se procede a la siembra de las placas, a una densidad de 50.000 - 85.000 células en placas de 24 pocillos, 250.000-350.000 en placas de 6 pocillos, y 10<sup>6</sup> en placas de 100 mm de diámetro. El medio se cambia cada 3 - 4 días.

### 3.2.3 Diferenciación del cultivo de astrocitos.

Durante esta Tesis se ha procedido a la diferenciación de los astrocitos con 2 compuestos diferentes: con Ara-C y con dibutil AMP cíclico (diBAMPc).

● Cuando el cultivo de astrocitos puro llega a un 80% de confluencia, se procede al tratamiento con Ara-C 4 µM (dilución 1/1000) del *stock* preparado. Es un compuesto que inhibe la síntesis de DNA, y que da lugar a que los astrocitos se paren en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, promoviéndose su diferenciación. Se

cultivan de esta forma durante 3 semanas, y entonces se proceden a hacer los experimentos. Esta diferenciación con Ara-C se lleva a cabo, porque experimentos previos en el grupo demostraron que se necesita este tratamiento para observar una localización de MLC1 en las uniones astrocitarias (Duarri et al., 2011). Por eso, éste es el modelo celular en el que normalmente trabajamos.

● La diferenciación de los astrocitos con diBAMPc se ha llevado a cabo porque durante este trabajo, se ha procedido a realizar registros electrofisiológicos de astrocitos de rata mediante la técnica de *Patch-Clamp*, en colaboración con el Dr. Xavier Gassul, profesor titular de la Universidad de Barcelona. Para dichos registros, los astrocitos deben estar diferenciados con diBAMPc porque los astrocitos que crecen en cultivo son células epitelioides poligonales algo aplastadas, y por tanto, cuesta más registrarlos. En cambio, cuando estas células son tratadas con diBAMPc, su morfología cambia, transformándose en células más estrelladas donde el cuerpo celular no queda tan aplastado, pudiendo ser registrados. Los astrocitos con diBAMPc se pueden registrar de manera óptima a las 2 semanas de diferenciación. Se cultivan en flascones y 3 días antes de llevar a cabo el experimento de *Patch-Clamp*, los astrocitos son tripsinizados y son plantados sobre cubres en placas de 24 pocillos a una confluencia en torno a las 10.000 células/pocillo.

#### **3.2.4 Soluciones necesarias para realizar *Patch-clamp* en astrocitos de rata diferenciados con diBAMPc.**

Solución externa: 144 mM NMDG, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, 5 mM Glucosa. pH 7,3

Solución Interna: 144 mM NMDG, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, 5 mM



EGTA, 5 mM Glucosa. pH 7,3

Para bloquear la corriente mediada por CIC-2 se utiliza una solución con yodo, que en células transfectadas o en oocitos de *Xenopus* puede llegar a inhibir hasta el 100% de la actividad del canal. En cambio, en astrocitos de rata diferenciados con diBAMPc, se ha descrito que esta inhibición no es del 100%, sino alrededor del 45% (Ferroni et al., 1997). Para ello, se sustituye en la solución externa el NMDG por NaI. Así, la solución externa sería: 144 mM NaI, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, 5 mM Glucosa. pH 7,3.

### **3.2.5 Aplicación de distintos tratamientos a los astrocitos primarios de rata diferenciados.**

Con el fin de avanzar en la relación funcional o fisiológica entre las proteínas MLC1, GlialCAM y CIC-2, se llevaron a cabo diferentes tratamientos a los astrocitos para ver si alguno de ellos daba lugar a algún efecto específico que pudiéramos observar y nos permitiera encontrar alguna relación entre dichas proteínas y entender un poco mejor la patofisiología de la enfermedad MLC. Así, se aplicaron tratamientos hiposmóticos y despolarizantes (con una elevada concentración de potasio). Además, se realizaron diferentes protocolos.

#### **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Astrocitos puros de rata diferenciados con Ara-C o diBAMPc, ya sea sembrados en placas de 6 pocillos, o sobre cubres en placas de 24 pocillos.
- **Solución fisiológica:** 122 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.

- **Solución hiposmótica:** 60 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 180 mOsm/kg de agua.
- **Solución de alto potasio 1:** 60 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.
- **Solución de alto potasio 2:** 80 mM NaCl, 40 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.
- **Solución de alto potasio 3:** 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.
- **Solución de alto potasio 4:** 110 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.
- **Solución fisiológica sin Calcio:** 122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 3 mM EGTA, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.
- **Solución de alto potasio sin Calcio:** 60 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>2</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 3 mM EGTA, 10 mM glucosa, pH 7,2, 300 mOsm/kg de agua.

### METODOLOGÍA

Se llevaron a cabo diferentes protocolos experimentales:

- 1) TRATAMIENTO CON LA SOLUCIÓN FISIOLÓGICA, HIPOSMÓTICA Y DE ALTO POTASIO DURANTE 1, 3, 6, 10 Y 24 HORAS.

Astroцитos diferenciados con Ara-C o diBAMPc durante 3 semanas plantados en placas de 6 pocillos fueron tratados durante 1, 3, 6, 10 y 24 horas con solución fisiológica, hiposmótica y de alto potasio 1, y tras dichos tratamientos, se solubilizaron. Posteriormente fueron procesados por WB si había algún cambio en el nivel de expresión de las proteínas MLC1, GlialCAM y CIC-2. Igualmente, astroцитos sembrados sobre cubres fueron tratados en las mismas condiciones (pero a 30 minutos, 1, 3 y 6 horas) y fueron procesados por inmunofluorescencia para detectar las mismas proteínas.

## 2) REVERSIÓN: TRATAMIENTO CON MEDIO DE ALTO POTASIO DURANTE 30 MINUTOS, 1, 3 Y 6 HORAS, Y POSTERIOR REVERSIÓN CON MEDIO FISIOLÓGICO.

Astroцитos diferenciados sembrados sobre cubres fueron tratados con medio alto en potasio (solución nº 1) y tras el tiempo del tratamiento, volvieron a incubarse con medio fisiológico, con el fin de observar si se recuperaba el fenotipo inicial. Tras el tratamiento, los astroцитos eran fijados y procesados por inmunofluorescencia (ver apartado 2.4). Así, los protocolos seguidos fueron:

{	30min Sol. Alto Potasio 1 + 30min Sol. Fisiológica
	1h Sol. Alto Potasio 1 + 30min Sol. Fisiológica
	1h Sol. Alto Potasio 1 + 1h Sol. Fisiológica
	3h Sol. Alto Potasio 1 + 1h Sol. Fisiológica
	3h Sol. Alto Potasio 1 + 2h Sol. Fisiológica
	6h Sol. Alto Potasio 1 + 1h Sol. Fisiológica
	6h Sol. Alto Potasio 1 + 2h Sol. Fisiológica

## 3) GRADIENTE DE POTASIO.

Astroцитos diferenciados sembrados sobre cubres fueron tratados

durante 1 hora con medio fisiológico y con diferentes medios con un gradiente de potasio (solución de alto potasio 1, 2, 3 y 4). Tras el tratamiento, los astrocitos eran fijados y procesados por inmunofluorescencia.

#### 4) TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN FISIOLÓGICA Y DE ALTO POTASIO PERO LIBRE DE CALCIO.

Astrocitos diferenciados sembrados sobre cubres fueron tratados durante 30 minutos, 1 y 3 horas con medio fisiológico y con medio alto en potasio (ambas soluciones sin calcio). Tras el tratamiento, los astrocitos eran fijados y procesados por inmunofluorescencia.

5) TRATAMIENTO DE IMITACIÓN A LAS CONDICIONES DESCRITAS EN EL ARTÍCULO "*Extracellular high K<sup>+</sup> stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels.*" de Yaguchi, T et al, publicado en 2010 en *J. Cell Physiol.*

Astrocitos diferenciados sembrados sobre cubres fueron tratados durante 5 minutos con solución fisiológica y seguidamente con solución de alto potasio nº 1 durante 25 minutos. En paralelo, el control sería 30 minutos con solución fisiológica. Tras el tratamiento, los astrocitos eran fijados y procesados por inmunofluorescencia.

### **3.3 TRANSFECCIÓN CELULAR.**

Durante esta Tesis, se ha procedido a la transfección de DNA en los diferentes tipos celulares estudiados de diferentes maneras. Así, en el caso de las líneas celulares de HeLa y HEK293 se ha usado la metodología de la transfección transitoria usando el fosfato cálcico, así como el sistema de liposomas, utilizando los compuestos lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) o la

Transfectina (*BioRad*). En el caso de los astrocitos primarios, el sistema que se ha usado para transfectarlos es un sistema lipídico, utilizando la lipofectina (*Invitrogen*).

### **3.3.1 Transfección transitoria con fosfato cálcico en células HeLa y HEK293.**

Este método se basa en la introducción de un co-precipitado de fosfato cálcico y DNA exógeno en el interior de la célula. El precipitado se adhiere inicialmente a la superficie de la célula y posteriormente es endocitado. Dicho precipitado se forma al mezclar dos soluciones, una solución salina que contiene cloruro cálcico y otra que contiene el fosfato. El DNA se queda incorporado en dicho precipitado, con lo que se endocitará con él. El éxito de una transfección depende de varios factores:

- 1) Uno de los más importantes es el pH de la solución que contiene el fosfato. Pequeñas variaciones del pH determinan el tamaño del precipitado y su entrada en la célula. Por ello, es recomendable probar la eficiencia de transfección con soluciones de fosfato de diferente pH, dentro de un rango óptimo teórico de 6,5 a 7,5. Este rango puede variar considerablemente entre las diferentes líneas celulares.
- 2) Otro parámetro importante en la formación del precipitado es la cantidad de DNA que se utiliza. En este caso se han utilizado 20  $\mu\text{g}$  de DNA para una placa de 10 cm de diámetro, 4  $\mu\text{g}$  de DNA en un pocillo de una placa de 6 pocillos, o 1  $\mu\text{g}$  en una placa de 24 pocillos. También es importante tener en cuenta la calidad del DNA que se utiliza: conviene que la concentración de dicho DNA sea superior a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y que generalmente sea obtenido a partir de maxi-preparaciones.

3) Finalmente, se debe tener en cuenta la densidad del cultivo celular en el momento de la transfección, parámetro que depende del tipo celular. Las células HeLa o HEK normalmente se transfectan bien a una confluencia del 45-60%.

### REACTIVOS

- Medio de cultivo DMEM completo (con 10% FBS inactivado, 1% penicilina/estreptomicina y 1% de glutamina).
- Cultivos celulares HeLa o HEK293T (45 - 60% de confluencia).
- Solución de cloruro cálcico (500 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM BES (*Fluka*)). Se ajusta a pH 6,95, se filtra con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  bajo la campana de cultivos, y se conserva a temperatura ambiente.
- Solución de fosfato (50 mM NaCl, 750  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 750  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM BES). Se preparan diferentes soluciones con diferencias de pH de 0,05, en un rango entre 6,5 y 7,5, ajustados con NaOH. Seguidamente se filtran y se conservan a temperatura ambiente.
- Agua miliQ estéril (filtrada).
- Preparación de DNA plasmídico de interés.

### METODOLOGÍA

El procedimiento que se explica a continuación es el óptimo para una placa de 10 cm de diámetro. Para placas de 6 pocillos, se utiliza 1/5 de los volúmenes.

1. Se siembran las células un día antes de efectuar la transfección, sobre un 20 - 30% de confluencia, con el fin de que la densidad sea la adecuada cuando se lleve a cabo dicho método.
2. Unas horas antes de llevar a cabo el proceso de transfección, se cambia

el medio de cultivo de las células por medio fresco.

3. Se prepara la mezcla de DNAs que se desea transfectar en tubos estériles de 15 ml. Para cada placa de 10 cm se han mezclado 18 µg de DNA, 2 µg de GFP (para monitorizar el nivel de transfección) y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 250 µl. En caso de que se desee efectuar una transfección doble, se mezclarán 9 µg de cada DNA.

4. A los 250 µl de la mezcla se les añaden 250 µl del tampón que contiene el calcio y se mezcla bien, dando ligeros golpes a la base del tubo.

5. Seguidamente, se añaden los 500 µl de la mezcla del DNA y el cloruro cálcico a 500 µl del tampón que contiene el fosfato, gota a gota, a la vez que se burbujea la muestra con una pipeta de 2 ml con ayuda de un pipeteador automático.

6. Se incuba la mezcla a temperatura ambiente (bajo la campana de cultivos) durante 15 minutos y finalmente, se inocula, gota a gota, en la placa que contiene las células, al mismo tiempo que se efectúa un movimiento en cruz de dicha placa, para que quede bien repartido. Las células se incuban a 37°C durante 12 - 20 horas.

7. Al día siguiente, se observan las células al microscopio para comprobar su integridad, ya que el proceso de transfección es ligeramente tóxico para ellas. A continuación, se lavan las placas 3 - 4 veces con PBS 1X estéril, con el fin de eliminar células muertas y restos de precipitados suspendidos en el medio y se añade medio de cultivo fresco. Posteriormente, las células se incuban de nuevo a 37°C durante 24 horas más.

8. Al día siguiente se monitoriza el número de células transfectadas, en el citómetro de flujo (FACS), midiendo el número de éstas que han incorporado GFP, así como se precede con el experimento que se quiera realizar.

### **3.3.2 Transfección transitoria con transfectina o lipofectamina 2000 en células HeLa y HEK293.**

#### REACTIVOS

- Medio de cultivo DMEM completo (con 10% FBS inactivado, 1% penicilina/estreptomicina y 1% de glutamina).
- Medio Opti-MEM con Glutamax (*Gibco*).
- Cultivos celulares HeLa o HEK293T (70 - 80% de confluencia).
- PBS 1X.
- Agente lipídico: transfectina (*BioRad*) o lipofectamina 2000 (*Invitrogen*).
- Agua miliQ estéril (filtrada).
- Preparación de DNA plasmídico de interés.

#### METODOLOGÍA

El procedimiento a seguir así como los volúmenes para cada tipo de placa vienen descritos en el manual del producto. El protocolo descrito a continuación es para placas de 6 pocillos.

1. Se siembran las células un día antes de efectuar la transfección, de forma que la confluencia sea de un 70-85%, pues para la transfección con agentes lipídicos se requiere una confluencia alta porque es un método bastante tóxico. Por tanto, se plantan a un 30-40% de confluencia.
2. Se prepara una mezcla con el DNA y el medio Opti-MEM, usando 2 µg de DNA en un volumen final de 250 µl.



3. En otro tubo se prepara una mezcla del agente lipídico en Opti-MEM. Así, también se prepara una mezcla en un volumen final de 250  $\mu$ l, y generalmente se usa una relación 1:1 del agente lipídico y el DNA. Por tanto, si se transfectan 2  $\mu$ g de DNA, se llevará cabo una mezcla de 2  $\mu$ l del agente lipídico + 248  $\mu$ l de Opti-MEM. En algunas ocasiones, se ha variado esta relación, aumentando la cantidad del agente lipídico por  $\mu$ g de DNA hasta una relación de 3:1. Esta mezcla no necesita tiempo de incubación para la formación de liposomas en el caso de la transfectina, pero sí en el caso de la lipofectamina 2000, que requiere un tiempo de incubación entre 5 - 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Posteriormente se juntan las dos mezclas (la del DNA con la del agente lipídico) y se dejan incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Mientras tanto, se retira el medio de cultivo de las placas y antes de añadirles 1,5 ml de medio Opti-MEM, se les hace un lavado con PBS 1X estéril, con el fin de eliminar trazas de antibiótico. Se dejan equilibrar en el incubador.
6. Acabado el tiempo de incubación, se añade la mezcla gota a gota a la placa, y se mueve ésta en cruz de manera que la mezcla quede bien repartida.
7. A las 4 h se retira el medio, se lavan las células con PBS 1X estéril, de manera que se eliminen los restos del agente lipídico que es tóxico, y se añaden 2 ml de medio DMEM completo. Se dejan incubar las células de 24 – 48 h en el incubador con el fin de que se expresen las proteínas.

### **3.3.3 Transfección transitoria con lipofectina en astrocitos primarios de rata.**

Los cultivos primarios de astrocitos presentan una baja eficiencia de transfección y sufren una alta mortalidad cuando son transfectados. Es por ello, que se probaron diferentes relaciones de DNA:lipofectina así como tiempos de

incubación para intentar reducir la mortalidad y conseguir un moderado nivel de transfección. Se usó la lipofectina porque previamente en el grupo se testó que era el agente lipídico con el que se conseguía obtener un mayor nivel de transfección.

### REACTIVOS

- Medio de cultivo DMEM completo (con 10% FBS inactivado, 1% penicilina/estreptomicina y 1% de glutamina) con o sin Ara-C 4  $\mu$ M.
- Medio Opti-MEM con Glutamax (*Gibco*).
- Cultivo primario de astrocitos (70 - 80% de confluencia).
- PBS 1X.
- Agente lipídico: lipofectina (*Invitrogen*).
- Agua miliQ estéril (filtrada).
- Preparación de DNA plasmídico de interés.

### METODOLOGÍA

Las cantidades de DNA que se transfectaron fueron 0,5  $\mu$ g para las placas de 24 pocillos, y 3  $\mu$ g para las placas de 6; y se usó una relación DNA:lipofectina de 1:2. Es importante tener en cuenta que se necesita que haya un porcentaje alto de confluencia. Se ha llevado a cabo la transfección de astrocitos tanto en estado de diferenciación con Ara-C durante 3 semanas, como en astrocitos no diferenciados. Si se transfectan astrocitos no diferenciados, éstos han de ser sembrados el día antes de llevar a cabo la transfección. La relación de células debe estar en torno a 80.000 células en el caso de placas de 24, y entre 400.000 células en el caso de placas de 6 pocillos. El protocolo que se detalla a continuación es para placas de 24 pocillos.

1. Primeramente se prepara la mezcla de lipofectina en un volumen final de 25  $\mu$ l de Opti-MEM (1  $\mu$ l de lipofectina + 24  $\mu$ l de Opti-MEM), y se deja incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Mientras tanto, se prepara la mezcla de DNA (0,5  $\mu$ g), también en 25  $\mu$ l de Opti-MEM.
3. Se juntan ambas mezclas y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retira el medio de las placas, se lava con PBS 1X estéril y se añaden 150  $\mu$ l de Opti-MEM por pocillo. Finalmente, se añaden los 50  $\mu$ l de la mezcla a las células gota a gota, y moviendo la placa.
5. Se deja incubar entre 1 - 3 horas, controlando la viabilidad de las células. Finalmente, se cambia el medio de las células por DMEM completo (generalmente con Ara-C si son astrocitos diferenciados) y se dejan entre 24-48 h en el incubador.

#### **3.3.4 Determinación de la eficiencia de transfección por citometría de flujo (FACS).**

Para determinar la eficiencia de transfección, el DNA exógeno se ha co-transfectado con la *green fluorescent protein* (GFP). Dicha proteína emite fluorescencia al ser excitada a una determinada longitud de onda, con lo que puede ser detectada por métodos fluorimétricos. De este modo, las células transfectadas con GFP (y por tanto, con el DNA exógeno) se distinguen de las no transfectadas, por la ausencia de fluorescencia de estas últimas. Para pasar las células por el citómetro de flujo, es necesario que las células estén tripsinizadas, para evitar agregaciones. Las células tripsinizadas se resuspenden entonces en medio fresco, y se transfieren a unos tubos

específicos para usar en el citómetro. Se lleva a cabo un protocolo que permite clasificar las células según el grado de fluorescencia. Durante esta Tesis, dichas determinaciones se han realizado en el “Servicio de Citometría de Flujo” de los “Servicios Científico-Técnicos” de la Universidad de Barcelona, en el campus de Bellvitge, siguiendo los protocolos recomendados por dicho servicio.

### **3.4. PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS.**

Debido a la dificultad de transfectar astrocitos primarios de rata se decidió optar por la producción de adenovirus que expresaran las proteínas que resultaban de interés para nuestro estudio. Los adenovirus (AdVs) son relativamente fácil de obtener así como de manipular. Además, la eficiencia de infección es muy alta, consiguiéndose un nivel de expresión de las proteínas también muy alto (en comparación a los que obteníamos mediante la transfección).

#### **3.4.1. Adenovirus.**

Los adenovirus son virus desnudos, icosaédricos, con fibras en sus vértices, y cuyo genoma (aprox. 36 Kb) está constituido por una doble cadena lineal de DNA. El genoma de los adenovirus se divide en genes tempranos (E1 a E4) y genes tardíos (L1 a L5). Puesto que la capacidad del genoma adenoviral para dirigir la producción de adenovirus reside en las secuencias ubicadas en E1, las estrategias para producir vectores adenovirales consisten en eliminar dichas secuencias e incorporar en su lugar el gen de interés, generando así un vector adenoviral sin capacidad de replicación. El posterior crecimiento y amplificación del vector se lleva a cabo utilizando una línea

celular complementaria, conteniendo la secuencia E1 en su genoma. Por último, el vector adenoviral conteniendo el gen de interés, es internalizado por un mecanismo mediado por receptor, y una vez en el endosoma se produce la lisis del mismo. El DNA viral conteniendo el gen de interés es liberado al citoplasma desde donde alcanza el núcleo y donde permanece como un DNA extracromosómico (episoma), dirigiendo la expresión del gen de interés.

### 3.4.2 Producción de adenovirus.

El sistema que se ha utilizado para la obtención de los adenovirus es el *ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen)*. Este sistema nos permite crear adenovirus no replicativos ni integrativos que son usados para la expresión temporal de los genes de interés, tanto en células eucariotas divisoras como no divisoras. Se consiguen obtener unos *stocks* virales de título alto, los cuales se pueden amplificar y purificar. Se ha de tener en cuenta que se ha de trabajar en condiciones de bioseguridad 2.

El vector de expresión que se ha usado es el pAdV/CMV/V5-DEST, el cual contiene los ITRs 5' y 3'; y la señal de encapsidación necesarios para empaquetar nuestro gen en los viriones. La proteína necesaria para la expresión de los genes tardíos E1, está integrado en la línea celular HEK293 en *trans*, la cual se utiliza para su producción.

### METODOLOGÍA

1. Primeramente se construyen los vectores de expresión con las secuencias de interés en el vector pAd/CMV/V5-DEST por el sistema *Gateway*, los cuales son secuenciados para confirmar que están correctos.
2. Con el fin de exponer los ITRs virales, se digieren entre 5-10 µg del plásmido pAd/CMV/V5-DEST que contiene nuestro gen de interés con la

enzima de restricción Pac I, a 37°C durante 12 - 16h. Se corre una pequeña alícuota para comprobar que la digestión ha funcionado y se purifica la digestión. Asimismo, se procede a precipitarla con el objeto de concentrar y purificar el DNA. Finalmente se cuantifica.

3. El día antes de comenzar la producción, se siembran células HEK293 (preferiblemente de pase bajo) en placas de 6 pocillos, en torno a  $7 \times 10^5$  células/pocillo, con medio DMEM completo que contiene aminoácidos no esenciales (NE-AA) y se incuban a 37°C en el incubador durante 12 - 16h.

4. Se procede a transfectar 1 µg de DNA digerido con Pac I en las células HEK293 con lipofectamina 2000 usando una relación de DNA:lipofectamina 2000 de 1:3, utilizando Opti-MEM con un 10% de FBS, pues se dejará la transfección durante toda la noche en el incubador a 37°C.

5. Al día siguiente se cambia el medio por DMEM completo con NE-AA y se deja incubar 24 h más en el incubador.

6. A las 48 post-transfección, las células se tripsinizan y se transfieren a una placa de 100 mm. Se dejan incubar durante 10 - 13 días hasta que se obtenga un 80% de efecto citopático. Durante los días previos, se cambia el medio si fuera necesario y se van observando las células, fijándonos si se van produciendo o no calvas.

7. Cuando el efecto citopático está en torno al 80-100%, se recoge el medio junto con las células (crudo viral) y se transfiere a un tubo de 15 ml bien resuspendido.

8. Se hacen 3 ciclos de congelación (30 minutos a -80°C) y descongelación (15 minutos como máximo a 37°C), y se procede a realizar una centrifugación del lisado celular durante 15 minutos a 3000 rpm.

9. Se hacen alícuotas con el sobrenadante en criotubos que se guardan a -80°C. Hay que tener en cuenta que aunque los *stocks* virales son bastante estables a los procesos de congelación-descongelación, es recomendable no usar *stocks* que hayan sido descongelados más de 10 veces, puesto que su título habrá disminuido.

### **3.4.3. Amplificación de adenovirus.**

Los *stocks* virales se pueden amplificar, e incluso purificar, con el fin de obtener un *stock* concentrado y más limpio, favoreciendo su uso en los casos donde se necesite una multiplicidad de infección (MOI) muy alta, ya que los *stocks* virales están compuestos, a parte de por las partículas virales, por medio y por restos celulares, que pueden interferir en determinados experimentos.

Para amplificar los adenovirus, se procede a sembrar una placa de 10 cm con células HEK293 de pase bajo, con medio DMEM completo con NE-AA. Esta placa se infecta (la infección se puede hacer en células en suspensión o adheridas a la placa) con el crudo viral de interés a una MOI de 1, y se incuban a 37°C en el incubador durante 2 - 4 días hasta que el efecto citopático es completo. Entonces se puede proceder de la misma manera que la descrita en el apartado anterior, o bien se puede proceder a la purificación de los adenovirus usando el *kit* comercial *Adeno-X Virus Mini Purification Kit* (Clontech), y siguiendo sus recomendaciones.

### **3.4.4 Titulación de adenovirus.**

La titulación de las partículas virales se puede hacer por 2 métodos, dependiendo de si el adenovirus que se ha construido expresa una proteína

fluorescente o no. En el primer caso, el mejor método de titulación es la citometría de flujo, mediante el uso del *FACS*; mientras que en los casos donde no se puede medir la fluorescencia, la titulación se hace por ELISA siguiendo un protocolo descrito de tinción con el anticuerpo anti-hexón (Majem et al., 2006), que es una proteína presente en el virus. También se puede titular haciendo otra tinción contra un epítipo presente en el gen de interés.

Generalmente, el título se obtiene utilizando las mismas células de producción, las HEK293, pero se ha de tener en cuenta que no todos los tipos celulares se infectan de la misma forma. Por eso, se pueden titular los adenovirus con cualquier tipo de línea celular.

#### Titulación por el método del $\alpha$ -hexón.

Este método se basa en una inmunocitoquímica de células haciendo servir un hibridoma 2Hx-2, aunque también se puede realizar con cualquier otro anticuerpo.

1. Se siembran las células HEK293 a razón de 40.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, con medio DMEM completo, conteniendo NE-AA. Se dejan incubar de 12 a 24 horas en el incubador a 37°C.
2. Se preparan diluciones seriadas (1/10) del *stock* viral en un volumen final de 100  $\mu$ l de medio DMEM completo + NE-AA. Es importante cambiar de punta cada vez que se pasa de un pocillo a otro, ya que podemos arrastrar partículas virales y no se haría correctamente la dilución seriada. Se incuban las células de 24 a 48 h en el incubador a 37°C.
3. Tras la incubación, se procede a retirar el medio con cuidado para no romper la monocapa de células. Se deja secar al aire durante 5 minutos.
4. Las células se fijan añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de metanol 100% frío y se



incuba durante 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

5. Se aspira el metanol con cuidado y se lavan las células 2 veces con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo con  $\text{PBS}^{2+}$ , el cual contiene  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que favorece que las células no se desenganchen.

6. Se incuba con el anticuerpo primario (1/5 si es el  $\alpha\text{-2Hx-2}$ , o 1/100 si es el caso de otro anticuerpo primario) en 50  $\mu\text{l}$  de solución de bloqueo ( $\text{PBS}^{2+}$ , 1% BSA), evitando la formación de burbujas. Se deja incubar 1 - 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Si se usa un anticuerpo diferente al  $\alpha\text{-hexón}$ , y necesita que las células sean permeabilizadas, se lleva a cabo un paso de permeabilización durante 15 minutos con  $\text{PBS 1X}$ , 0,1% Tritón X-100 antes de la incubación con el anticuerpo primario.

7. Se lavan las células 3 veces con  $\text{PBS}^{2+}$ , 1% BSA.

8. Se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo a una dilución 1/500 en  $\text{PBS}^{2+}$ , 1% BSA, durante 1 - 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , y protegido de la luz. En el caso de usar el hibridoma del  $\alpha\text{-2Hx-2}$ , se usa el anticuerpo secundario *anti-mouse*.

9. Se lavan los pocillos 3 veces con  $\text{PBS}^{2+}$  1% BSA, y se cuantifican las células fluorescentes en un microscopio invertido de fluorescencia.

Si se observa una nube de células fluorescentes, se cuenta como una célula, pues se sugiere que ha habido una infección secundaria. Se hace el recuento en la dilución donde haya más células positivas que se puedan contar, aunque es recomendable que para cada *stock* viral se use la media de diferentes diluciones para calcular la concentración. Es importante tener en cuenta que solo se ha usado 100  $\mu\text{l}$  para cada dilución, por lo que se ha de aplicar un factor de 10X para obtener la correcta TU/ml. Por ejemplo, si se

cuentan 100 células en la dilución  $10^{-5}$ , eso son  $1 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$ , y por tanto, sería un título de  $10^8$  TU/ml.

	<b>ADENOVIRUS</b>	<b>Título (TU/ml)</b>
1	GlialCAM-3xFlag	$3 \cdot 10^8$
2	GlialCAM R92Q-3xFlag	$5 \cdot 10^9$
3	GlialCAM R98C-3xFlag	$8 \cdot 10^8$
4	GlialCAM S196Y-3xFlag	$8 \cdot 10^8$
5	GlialCAM P148S-3xFlag	$6 \cdot 10^8$
6	GlialCAM R92W-3xFlag	$9 \cdot 10^8$
7	GlialCAM G89D-3xFlag	$8 \cdot 10^8$
8	GlialCAM G89S-3xFlag	$5 \cdot 10^8$
9	GlialCAM D128N-3xFlag	$5 \cdot 10^8$
10	GlialCAM deltaC-3xFlag	$2 \cdot 10^8$
11	GlialCAM-esmGFP	$1 \cdot 10^8$
12	3xFlag-rCLC-2	$1 \cdot 10^9$
13	rCLC-2-mCherry	$1 \cdot 10^8$
14	hCLC-2 HA- Cypet	$4 \cdot 10^7$
15	hMLC1-esmGFP	$2 \cdot 10^8$
16	HA-hMLC1 P92S-HAloop	$1 \cdot 10^8$
17	YFP Cl <sup>-</sup>	$5 \cdot 10^7$

**Tabla 2. Adenovirus generados.** Tabla donde se muestran los diferentes adenovirus producidos con el título correspondiente.

### 3.5 TRANSDUCCIÓN DE ASTROCITOS CON ADENOVIRUS.

Para infectar astrocitos con adenovirus, el procedimiento rutinario es el siguiente:

1. Una vez conseguido el cultivo puro de astrocitos después de la fuerte agitación durante toda la noche, los astrocitos se tripsinizan y se siembran en el tipo de placas según se quiera realizar un experimento u otro. Así por ejemplo, si se quiere realizar un análisis por WB, se han de plantar los astrocitos en placas de 6 pocillos, si se quiere medir la expresión en superficie, se han de plantar en placas de 35 mm, y si se quieren hacer en última instancia inmunocitoquímicas, se han de sembrar sobre cubres en placas de 24 pocillos. Normalmente la densidad de células por placa es la siguiente: 50.000 - 85.000 células en placas de 24 pocillos, 250.000 - 350.000 en placas de 6 pocillos, y

en placas de 35 mm. Después de la siembra, se deja que pasen 2 - 3 días antes de añadir Ara-C, pues es conveniente que la superficie de la placa esté en torno al 85%. Entonces, se dejan diferenciar durante 3 semanas en el incubador a 37°C y se les va cambiando el medio cada 3 - 4 días.

2. Antes de que se cumplan las 3 semanas de diferenciación se llevará a cabo la infección de los astrocitos con los adenovirus. Para ello se elimina un poco de medio de los pocillos y los adenovirus son añadidos, generalmente a una MOI de 2 o 3.

3. Al día siguiente, el medio es retirado y se lleva a cabo un lavado con PBS 1x estéril, con el fin de eliminar los restos de virus que puedan quedar. Se vuelve a añadir medio fresco completo (también con Ara-C) y se dejan incubar a 37°C en el incubador 24 - 48 horas más, hasta que son procesados.

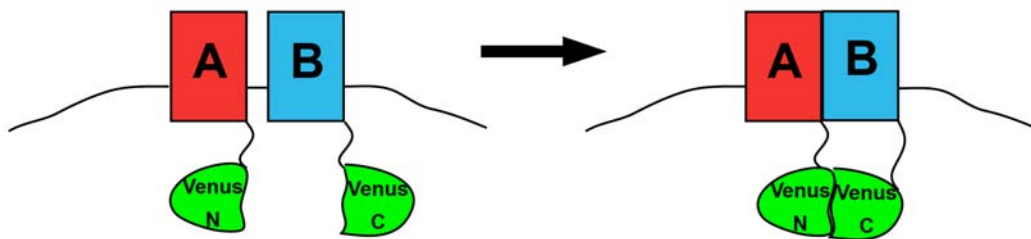
#### **4. MÉTODOS DE COMPLEMENTACIÓN DE FRAGMENTOS DE PROTEÍNA.**

Los métodos basados en la complementación de fragmentos de proteínas han sido muy utilizados a lo largo de la Tesis, puesto que han sido métodos que se pusieron a punto con el fin de poder validar las interacciones putativas entre MLC1 y sus posibles candidatos, así como métodos complementarios para demostrar la interacción directa entre MLC1 y GlialCAM, así como de GlialCAM y CIC-2.

##### **4.1 COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR DE FLUORESCENCIA (BiFC).**

Durante esta Tesis, esta metodología se puso a punto en el laboratorio con una serie de proteínas control. Para la realización de la complementación

bimolecular de fluorescencia (Kerppola, 2008a; Kerppola, 2008b), (Ciruela, 2008) se utilizó como proteína fluorescente reportera la proteína Venus, que es una versión mejorada de la proteína fluorescente amarilla YFP (Nagai et al., 2002). La proteína Venus fue dividida a la mitad en dos fragmentos: Venus-N (correspondiente a los aminoácidos 1 al 156) y Venus-C (aminoácidos 157 al 239). Utilizando la metodología del sistema *Multisite Gateway Cloning* (Invitrogen) (ver apartado 1.3.2), se fusionó a la región C terminal de diferentes proteínas, (ver capítulo 2 de resultados) las dos mitades de la proteína Venus. La integridad de todas las construcciones fue confirmada por secuenciación.



**Figura 27: Esquema representativo del método *BiFC*.** La proteína reportera Venus es dividida a la mitad, y cada una de las mitades se fusiona a una proteína de interés. Si las proteínas interaccionan, como estarán muy juntas, la proteína Venus podrá reconstituirse y se podrá observar fluorescencia. La principal ventaja del método es que permite visualizar el lugar de la célula donde ocurre la interacción.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Placas de 6 pocillos.
- Placas de 24 pocillos.
- Medio DMEM (*Biological Industries*) completo (con 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomycin, 1% Glutamina).
- Medio de transfección Opti-MEM con Glutamax (*Gibco*).
- PBS 1X estéril.
- Transfectina (*BioRad*) o soluciones de transfección con fosfato cálcico.
- Células HeLa transfectadas.

- Microscopio invertido de fluorescencia (*Olympus DSU con spinning disk*)

### METODOLOGÍA

1. Se siembran alrededor de 380000 células HeLa en placas de 6 pocillos, y se dejan en el incubador a 37°C durante 12 - 16h.
2. Al día siguiente, las células estarán a una confluencia adecuada (80%) y son transfectadas con las correspondientes construcciones usando transfectina (*Bio-Rad*) (ver apartado 3.3.2). Si son transfectadas usando fosfato cálcico, la confluencia a la que son sembradas el día antes será menor (ver apartado 3.3.1). La cantidad de DNA transfectado es de 2 µg, (si se transfecta con transfectina), o de 4 µg (si se transfecta con fosfato cálcico), transfectándose a un ratio 1:1 cada construcción que porta la mitad de la proteína Venus:

Si se transfecta con transfectina: {

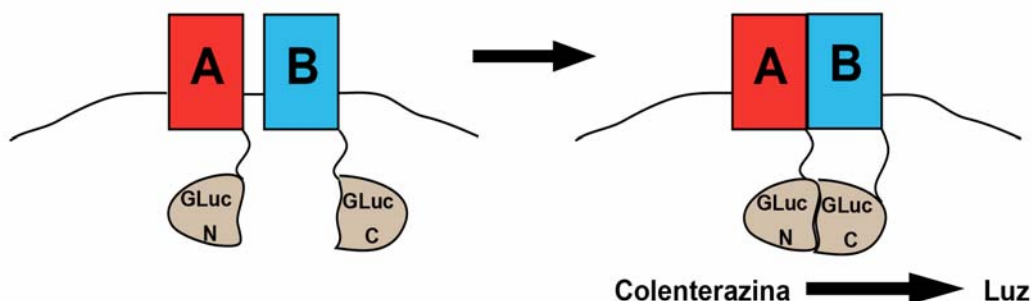
- 1µg del plásmido que codifica para proteína A-VenusN.
- 1µg del plásmido que codifica para proteína B-VenusC.

3. Después de 24 horas, las células son tripsinizadas y son sembradas en cubres en placas de 24 pocillos. Se dejan incubar 24 horas más en el incubador a 37°C. También se ha probado a incubarlas durante estas 24 horas a 30°C, con el fin de favorecer el plegamiento.
4. A las 48 h después de la transfección, las células pueden observarse en un microscopio de fluorescencia. Se deben transfectar siempre las construcciones que contienen cada una de las proteínas con la fusión de la mitad de Venus de manera individual, para ver el fondo o *background* fluorescente que pueden presentar, aunque generalmente nunca dan señal por sí solas. Cuando se co-transfectan ambas construcciones que codifican para las dos proteínas con las dos mitades de Venus, y éstas interaccionan, la proteína Venus podrá reconstituirse y se verá señal fluorescente. Es importante también

hacer combinaciones con proteínas que se sabe que no interaccionan para valorar también el grado de inespecificidad del experimento.

#### 4.2 COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR DE LUMINISCENCIA (BiLC).

Durante este trabajo, esta metodología también se puso a punto en el laboratorio. En el método de *BiLC* se ha utilizado la *Gaussia luciferasa* (GLuc) humanizada como proteína reportera. GLuc es una proteína monomérica de 185 aminoácidos procedente del copépodo marino *G.princeps*, que cataliza la oxidación del sustrato colenterazina en una reacción que emite luz azul a 480 nm (Tannous et al., 2005), (Kim et al., 2009) , (Remy and Michnick, 2006). Para llevar a cabo el método de *BiLC* se fusionaron ambos fragmentos de la proteína GLuc (dividida del aminoácido 1 al 93 ; y del 94 al 179) al extremo C terminal de diferentes proteínas, tanto controles como proteínas de interés (ver capítulo 2 de resultados). Se utilizó el sistema *Multisite Gateway Cloning* (*Invitrogen*) (ver apartado 1.3.2) para la construcción de los clonajes necesarios para poder llevar a término la realización del método. La integridad de todas las construcciones fue confirmada por secuenciación.



**Figura 28: Esquema representativo del método *BiLC*.** La proteína reportera *Gaussia Luciferasa* (GLuc) es dividida a la mitad, y cada una de las mitades se fusiona a una proteína de interés. Si las proteínas interaccionan, como estarán muy juntas, la proteína GLuc podrá reconstituirse y se podrá cuantificar la señal de luminiscencia en un luminómetro. Te permite cuantificar en unidades relativas el grado de interacción.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Placas de 6 pocillos.
- Placas de uso para el luminómetro, de 35 mm.
- Medio DMEM (*Biological Industries*) completo (con 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% Glutamina).
- Medio de transfección Opti-MEM con Glutamax (*Gibco*).
- PBS 1X estéril.
- Transfectina (*BioRad*) o soluciones de transfección con fosfato cálcico.
- Células HeLa transfectadas.
- Colenterazina nativa (*Nanolight Technology*).
- Tampón de solubilización (PBS 1X, 1% Tritón, inhibidores de proteasas).
- Kit comercial  $\beta$ Galactosidase Detection Kit II (*Clontech*).
- Luminómetro TD-20/20 (*Turner BioSystems*).

### METODOLOGÍA

1. Se siembran alrededor de 380.000 células HeLa en placas de 6 pocillos, y se dejan en el incubador a 37°C durante 12 - 16h.
2. Al día siguiente, las células estarán a una confluencia adecuada (80%) y son transfectadas con las correspondientes construcciones usando transfectina (*Bio-Rad*) (ver apartado 3.3.2). Si son transfectadas usando fosfato cálcico, la confluencia a la que son sembradas el día antes será menor (ver apartado 3.3.1). La cantidad de DNA transfectado es de 2  $\mu$ g, (si se transfecta con transfectina), o de 4  $\mu$ g (si se transfecta con fosfato cálcico), transfectándose a un ratio 1:1 cada construcción que porta la mitad de la proteína GLuc, pero teniendo en cuenta que también se transfecta el plásmido pCMV- $\beta$ Gal para normalizar, a razón 1:10.

Si se transfecta con transfectina:

- 0,9  $\mu$ g del plásmido que codifica para proteína A-GLucN.
- 0,9  $\mu$ g del plásmido que codifica para proteína A-GLucC.
- 0,2  $\mu$ g del vector pCMV- $\beta$ Gal, como control de la eficiencia de transfección.

3. Después de 24 horas, las células son tripsinizadas y son sembradas en placas de 35 mm, a razón de 2 placas por punto (las células del pocillo de 6 se divide en 2 plaquitas). Se dejan incubar 24 horas más en el incubador a 37°C.

4. Después de 48 horas después de la transfección, las células se lavan con PBS 1X para eliminar restos del medio de cultivo. La colenterazina nativa se reconstituye en metanol para crear un *stock* de 1 mg/ml; y se aplica a las células a una concentración de 20  $\mu$ M (en PBS 1X estéril). Inmediatamente a poner el sustrato colenterazina se mide en el luminómetro.

5. Para normalizar los datos, las células son solubilizadas y se usan 30  $\mu$ l del lisado celular para medir la actividad de la enzima  $\beta$ Galactosidasa con el *kit* comercial  *$\beta$ Galactosidase Detection Kit II (Clontech)* en el mismo luminómetro (ver apartado 4.2.1).

6. Una vez obtenidos todos los datos, se divide el valor de luminiscencia obtenido entre el valor de la actividad  $\beta$ Galactosidasa. Hay que tener en cuenta que siempre se transfecta la construcción con la proteína en estudio fusionada al fragmento GLuc-N o al fragmento GLuc-C solas, para tener una señal de actividad basal. Por tanto, se hace una media del valor de luminiscencia/actividad- $\beta$ Galactosidasa obtenido para estas construcciones transfectadas solas y se resta posteriormente al resto de interacciones medidas. También puede dividirse para calcular las veces de inducción



obtenidas, ya que consideramos estas construcciones como nuestro control basal.

#### **4.2.1 Medición de la actividad $\beta$ Galactosidasa.**

Este ensayo es muy útil para controlar los niveles de transfección si se quieren comparar distintas muestras dentro de un mismo experimento, y así, normalizar los datos. Durante esta Tesis se ha llevado a cabo para normalizar los datos de las mediciones obtenidas a través del *BiLC* y del *split-Tev*.

##### MATERIALES Y REACTIVOS

- Extracto celular solubilizado.
- *Reaction Buffer* y *Reaction Substrate* ( *$\beta$ Galactosidase Detection Kit II*, Clontech).
- Luminómetro TD-20/20 (*Turner BioSystems*).

##### METODOLOGÍA

1. Se prepara la mezcla de la reacción final que sirve para medir la actividad  $\beta$ Galactosidasa: se preparan 196  $\mu$ l del *Reaction Buffer* con 4  $\mu$ l de *Reaction Substrate* para cada muestra.
2. Se inoculan 30  $\mu$ l de extracto solubilizado (de cada muestra) en un tubo *eppendorf*.
3. Se añaden los 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción a cada extracto y se mezcla ligeramente. Se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se registra la emisión de luz en un luminómetro, muestra a muestra: desde el primer tubo hasta el último; y cuando se procesa la última muestra, se vuelve a registrar al revés, desde el último tubo hasta el primero. Cada muestra se detecta 2 veces porque la actividad, durante 1 hora después de la

incubación, no cesa; y de esta manera, hacemos una media de los 2 valores obtenidos.

#### **4.3 MÉTODO DE COMPLEMENTACIÓN DE LA ACTIVIDAD TEV PROTEASA (*SPLIT-TEV*).**

Este método fue puesto a punto en el laboratorio por mi compañero, el doctorando Xavier Capdevila Nortes. Fue utilizado para demostrar la interacción entre MLC1 y GlialCAM, así como entre GlialCAM y CIC-2. También se usó para estudiar cómo afectaban las mutaciones en *GLIALCAM* encontradas en pacientes de MLC a la homo-oligomerización de GlialCAM, y a la hetero-interacción con MLC1 y CIC-2.

La *Tev* proteasa que se utilizó fue una forma mutante (S219V) porque prevenía su auto-digestión sin afectar a su eficiencia catalítica. El sustrato oligopeptídico que fue utilizado como sitio de reconocimiento de la *Tev* proteasa fue ENLYFQS; y el factor de transcripción quimérico usado fue el GV, el cual se obtuvo del vector pM3-VP16 (*Clontech*) y contiene el dominio de unión al DNA de levadura Gal4, y el dominio de trans-activación VP16 del virus herpes simplex. Cuando la *Tev* proteasa es activada y corta, el factor de transcripción GV se transloca al núcleo e induce la expresión de un gen reportero, que en nuestro caso es la *Gaussia Luciferasa* secretable (pNEBr-X1Gluc, *New England BioLabs*).

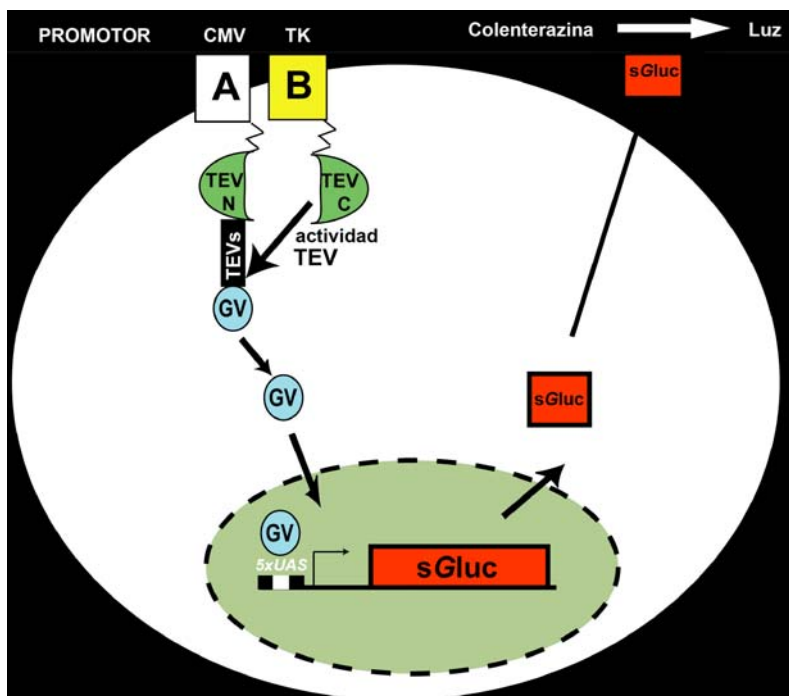
Nosotros dividimos la *Tev* proteasa en 2 fragmentos:

- *Tev-N*, que consiste en los residuos 1 - 118.
- *Tev-C*, que contiene los residuos 119 - 242.

Por un lado, se llevó a cabo la fusión del fragmento *Tev-N*, el sitio de reconocimiento de la *Tev* proteasa y el factor de transcripción quimérico GV, al

dominio C- terminal de diferentes proteínas (ver capítulo 2 de resultados) en un vector pCDNA3 con un promotor de alta expression citomegalovirus (CMV). Por otro lado, se fusionó el fragmento Tev-C al dominio C-terminal de otras proteínas (ver capítulo 2 de resultados). Solo en el caso de la proteína 4F2hc, la fusión se llevó a cabo en el N-terminal. Todas las proteínas con los fragmentos Tev-C fusionados, fueron clonados en un vector pCDNA6.2/V5-pL Dest, con el promotor de la timidina quinasa del virus herpes simplex (HSV-TK), el cual daba lugar a niveles moderados de expresión.

Todas las construcciones fueron hechas mediante PCR con la *KOD Hot Start polymerase* (Calbiochem), añadiendo los sitios de recombinación *attB1*, *attB2*, *attB5R* o *attB5* compatibles con el sistema *Multisite Gateway* de *Invitrogen* (ver apartado 1.3.2). La integridad de todas las construcciones fue confirmada por secuenciación.



**Figura 29: Esquema representativo del método split-Tev.**

La proteína reportera de este método es la TEV proteasa, la cual es dividida a la mitad, y cada fragmento es fusionado a proteínas candidatas a interactuar. Así, tenemos una proteína de interés (A, en blanco), la cual contiene fusionado el fragmento TEV-N, el sitio de reconocimiento de la Tev proteasa, y el factor de transcripción GV, bajo el control de un promotor de alta expression CMV.

La otra proteína de interés (B, en amarillo) está fusionada al fragmento Tev-C y su expresión está controlada por el promotor de baja expression TK. Si hay interacción entre las 2 proteínas, se consigue reconstituir la actividad de la TEV proteasa, la cual corta y libera el factor de transcripción GV que es capaz de entrar en el núcleo y activar la expresión del gen reportero, (que en nuestro caso es una Gaussia luciferasa secretada) después de unirse a 5 elementos de respuesta Gal4 (5xUAS). La luciferasa es entonces liberada al medio de cultivo y su actividad puede monitorizarse después de la adición de colenterazina en un luminómetro.

La luciferasa es entonces liberada al medio de cultivo y su actividad puede monitorizarse después de la adición de colenterazina en un luminómetro.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Placas de 6 pocillos.
- Medio DMEM (*Biological Industries*) completo (con 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% Glutamina).
- Medio de transfección Opti-MEM con Glutamax (*Gibco*).
- PBS 1X estéril.
- Transfectina (*BioRad*).
- Células HeLa transfectadas.
- Colenterazina nativa (*Nanolight Technology*).
- Tampón de solubilización (PBS1x, 1% Tritón, inhibidores de proteasas).
- Kit comercial  $\beta$ Galactosidase Detection Kit II (*Clontech*).
- Luminómetro TD-20/20 (*Turner BioSystems*).

### METODOLOGÍA

1. Se siembran alrededor de 380.000 células HeLa en placas de 6 pocillos, y se dejan en el incubador a 37°C durante 12 - 16h.
2. Al día siguiente, las células estarán a una confluencia adecuada (80%) y son transfectadas con las correspondientes construcciones usando transfectina (*Bio-Rad*) (ver apartado 3.3.2). La cantidad de DNA transfectado es de 2  $\mu$ g, con los siguientes ratios:

- 0,75  $\mu$ g de cada plásmido que codifica para las proteínas que contienen los fragmentos Tev-N y Tev-C.
- 0,35  $\mu$ g del gen reportero pNEBr-X1GLuc.
- 0,2  $\mu$ g del vector pCMV- $\beta$ Gal, como control de la eficiencia de transfección.

3. Después de 48 horas, se recogen 20  $\mu$ l del sobrenadante de las células y se analizan en un luminómetro después de la adición de colenterazina nativa a 20  $\mu$ M (en PBS 1X estéril).
4. Para normalizar los datos, las células son solubilizadas y se usan 30  $\mu$ l del lisado celular para medir la actividad de la enzima  $\beta$ Galactosidasa con el *kit* comercial  *$\beta$ Galactosidase Detection Kit II (Clontech)* en el mismo luminómetro (ver apartado 4.2.1).
5. Una vez obtenidos todos los datos, se divide el valor de luminiscencia obtenido entre el valor de la actividad  $\beta$ Galactosidasa. Hay que tener en cuenta que siempre se transfecta la construcción con la proteína en estudio fusionada al fragmento Tev-N + sitio de reconocimiento de la Tev + factor de transcripción GV sola, de modo que se tenga una idea del ruido o *background* de dicha proteína sola, pues puede tener algo de auto-proteólisis y algo de actividad basal. El valor de luminiscencia/actividad- $\beta$ Galactosidasa obtenido para esta construcción es posteriormente restado al resto de interacciones medidas. También puede dividirse para calcular las veces de inducción obtenidas, ya que consideramos esta construcción como nuestro control basal.

## **5. APÉNDICE. SOLUCIONES DE USO GENERAL.**

### **AMPICILINA**

Se disuelve la ampicilina en agua MiliQ a 100 mg/ml, se filtra a 0,22 µm y se guarda alicuotada a -20°C. Una vez descongelada, debe mantenerse en hielo. Es conveniente tener en cuenta que la ampicilina se inactiva a temperaturas superiores a 55°C. Se trabaja a 100 µg/ml.

### **CLORANFENICOL**

Se disuelve en 25 mg/ml de metanol. Se guarda alicuotada a -20°C. La concentración de trabajo es 25 µg/ml.

### **KANAMICINA**

Se disuelve la kanamicina a 25 mg/ml en agua MiliQ y se alicuota a -20°C. La concentración de trabajo es 25 µg/ml.

### **MEDIO LB, LB AGAR**

Se disuelve en agua MiliQ, 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl. En el caso de preparar LB-agar, se añade el agar (1,5% en peso) en la botella que contiene LB, justo antes de autoclavarlo. Se deja enfriar hasta 50°C, y se añaden el antibiótico (si es necesario). Se vierte el medio sobre las placas y se dejan solidificar a temperatura ambiente. Las placas se guardan posteriormente a 4°C en posición invertida.

### **TAE 50X**

Se pesan 242g de Tris Base, y se añaden 57,1 ml de ácido acético, y 100 ml de EDTA 0,5M. Se ajusta con agua hasta 1 litro.

### **TAMPÓN DE CARGA DNA 10X**

(1% SDS, 50% Glicerol, 0,05% azul de bromofenol). Para 40 ml: 0,4 g de SDS, 20 ml de glicerol y 2 ml de azul de bromofenol al 1%.

**PBS 10X**

Se disuelve en agua MiliQ, 1,36 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y se ajusta el pH a 7,4 con HCl. Si el PBS 1X es para cultivos, se autoclava.

**PBS<sup>2+</sup>**

Al PBS se le añade 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de Mg(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

**PARAFORMALDEHID (PFA) 3% EN PBS**

Imprescindible manipular el PFA bajo la campana porque es muy tóxico. Para 500 ml, se pesan 15 g de paraformaldehído en un vaso de precipitado de vidrio. En otro vaso, se calientan 450 ml de agua MiliQ hasta que llega a 60°C. Se procede a ir tirando agua caliente sobre el vaso con el PFA y se va mezclando en un agitador. Cuando está disuelto se tiran 2 - 3 gotas de NaOH 1 N hasta que la solución quede transparente. Se deja enfriar y se añaden 50 ml de PBS 10X. Se hacen alícuotas y se congelan a -20°C.

**TAMPÓN DE CARGA DE PROTEÍNAS LSB 4X**

En un volumen de 40 ml se preparan 8 ml de Tris HCl 2 M a pH 6,8 + 32 ml de glicerol + 3,2 g de SDS + 160 µl de azul de bromofenol. Si es necesario se pueden añadir agentes reductores: 1 - 10% β-Mercaptoetanol o 100 mM DTT.

**TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 10X**

(Tris base 250 mM, glicina 1,91 M, SDS 1%). Para 1 litro se pesan: 30,3 g de Tris, 144 g de Glicina y 10 g de SDS. Se ajusta el pH a 8,3.

**TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 10X**

(Tris base 250 mM, glicina 1,92 mM). Para 1 litro se pesan 30,3 g de Tris y 144 g de glicina. Se ajusta a pH 8,3. Tampón de Transferencia 1X: 100 ml de tampón de transferencia 10X + 200 ml de metanol + 700 ml de agua. Se puede

reciclar un par de veces guardándolo a 4°C.

### **TTBS 10X**

Se disuelve en agua MiliQ, 1,5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, y se ajusta a un pH de 7,4. Posteriormente se le añade 1% de Tween-20 o Tritón X-100 y se agita suavemente hasta que el detergente quede bien disuelto.

### **ECL**

Se preparan 2 soluciones *stock*: una de 90 mM de ácido cumárico, y otra de 250 mM de luminol, ambas con DMSO, protegidas de la luz y guardadas a -20°C.

Solución A: 5 ml Tris 1M pH 8,5, 45 ml agua, 110 µl ácido cumárico 90 mM, 250 µl luminol 250 mM.

Solución B: 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y 900 µl de agua.

Ambas soluciones se guardan a 4°C protegidas de la luz.

El reactivo ECL para revelado: 1 ml solución A + 15 µl solución B.

### **TRIS 1 M**

Se pesan 60,5 g en 500 ml de agua miliQ. Se ajusta al pH deseado y se filtra.

### **EDTA 0,5 M**

Se disuelven 90,3 g de EDTA en agua destilada y se ajusta el pH a 8 con NaOH (la solución se vuelve entonces transparente).

### **HEPES 1 M**

Se pesan 119 g en 500 ml de agua miliQ y se ajusta el pH a 7,4. Se filtra.

### **AGUA TRATADA CON DEPC (DIETILPIROCARBONATO)**

Se disuelve DEPC al 0,01% en agua MiliQ-Millipore, bajo una campana extractora. Se deja durante 16 horas a 37°C con agitación y se autoclava con el fin de inactivar el DEPC.



**6. ANEXO: CONSTRUCCIONES GENERADAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

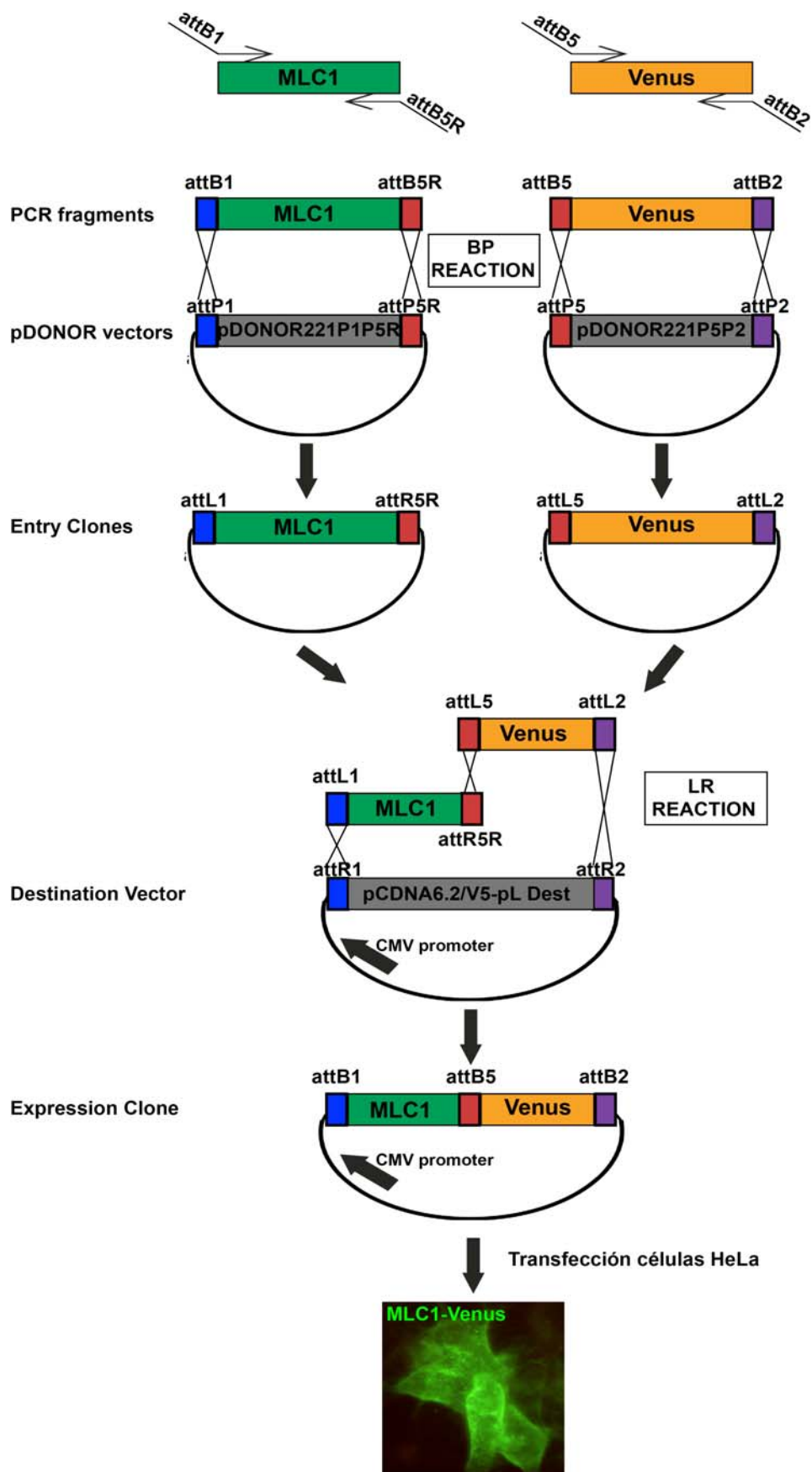
<p><b>ENTRY CLONES PARA INSERCIÓN DE EPÍTOPOS</b></p> <p>1 3xFlag B1B5R 2 3xFlag B5B2 3 3xHA B1B5R 4 3xHA B5B2</p>	<p><b>ENTRY CLONES PROTEÍNAS CONTROL</b></p> <p>40 zipper B1B5R 41 D2R B1B5R 42 hA2Aflag B1B5R 43 GabaBR1myc B1B5R 44 GabaBR2 B1B5R 45 LAT2 B5B2 37 4F2hc B5B2 38 Transf.R B5B2 39 Mash B1B5R 40 Mash delta hlh B1B5R 41 E47 B1B5R</p>
<p><b>ENTRY CLONES PARA <i>BiFC</i></b></p> <p>5 Venus B1B5R 6 Venus link B1B5R 7 mCherry B1B5R 8 mCherry link B1B5R 9 Venus B5B2 10 linker Venus B5B2 11 mCherry B5B2 12 linker mCherry B5B2 13 Venus-N linker B1B5R 14 Venus-C linker B1B5R 15 linker Venus-N B5B2 16 linker Venus-C B5B2 17 linker Venus linker B4R B3R 18 linker Cherry linker B4R B3R</p>	<p><b>ENTRY CLONES PROTEÍNAS CANDIDATAS</b></p> <p>42 GlialCAM B1B5R 43 Claudina-1 B1B5R 44 CD9 B5B2 45 ZO1 B1B2 46 ZO1 B1B5R 47 ZO1 B5B2 53 CIC-2 B1B2 54 CIC-2 B1B5R 55 CIC-2 B5B2</p>
<p><b>ENTRY CLONES PARA <i>BiLC</i></b></p> <p>19 Gluc B1B2 20 linker Gluc B5B2 21 Gluc-N linker B1B5R 22 Gluc-C linker B1B5R 23 linker Gluc-N B5B2 24 linker Gluc-CB B5B2 25 linker SG Gluc-N B5B2 26 linker SG Gluc-C B5B2</p>	<p><b>ENTRY CLONES MUTANTES DE GLIALCAM</b></p> <p>56 GlialCAM R92Q B1B5R 57 GlialCAM R98C B1B5R 58 GlialCAM S196Y B1B5R 59 GlialCAM P148S B1B5R 60 GlialCAM R92W B1B5R 61 GlialCAM G89D B1B5R 62 GlialCAM G89S B1B5R 63 GlialCAM D128N B1B5R 64 GlialCAM L23H B1B5R 65 GlialCAM W263X B1B5R 66 GlialCAM deltaC B1B5R 67 GlialCAM delta Extrac. B1B5R</p>
<p><b>ENTRY CLONES PARA <i>FRET</i></b></p> <p>27 Cypet linker B1B5R 28 linker Cypet B5B2 29 Ypet linker B1B5R 30 linker Ypet B5B2</p>	<p><b>ENTRY CLONES RELACIONADOS CON CLCs</b></p> <p>68 hCIC-2HA B1B5R 69 CIC-2 E211V B1B5R 70 CIC-2 C256A B1B5R 71 CIC-2 H536F B1B5R 72 CIC-1 B1B5R 73 CIC-5 B1B5R</p>
<p><b>ENTRY CLONES DE MLC1</b></p> <p>31 hMLC1 B1B2 32 hMLC1 B1B5R 33 hMLC1 B5B2 34 HA MLC1 HA B1B5R 35 HA MLC1 HA B5B2 36 MLC1 (HA) sp A B1B4 37 MLC1 (HA) sp B B1B4 38 zMLC1 B1B5R 39 zMLC1 B5B2</p>	

<b>EXPRESSION CLONES DE MLC1 CON EPÍTOPOS</b>	<b>EXPRESSION CLONES PROTEÍNAS CONTROL PARA MÉTODOS INTERACCIÓN</b>
1 3xFlag - hMLC1 pCDNA3	61 A2AR <sup>flag</sup> - 3xFlag pCDNA3
2 hMLC1 - 3xFlag pCDNA3	62 A2AR <sup>flag</sup> - 3xHA pCDNA
3 3xHA - hMLC1 pCDNA3	63 A2AR <sup>flag</sup> - link Venus pCDNA3
4 hMLC1 - 3xHA pCDNA3	64 A2AR <sup>flag</sup> - link Venus-N pCDNA3
<b>EXPRESSION CLONES DE MLC1 PARA CREAR PROTEÍNA FUOESCENTES</b>	65 A2AR <sup>flag</sup> - link Venus-C pCDNA3
5 HA MLC1-Venus pCDNA3	66 A2AR <sup>flag</sup> - link Gluc pCDNA3
6 Venus-HA MLC1 pCDNA3	67 A2AR <sup>flag</sup> - linkSG Gluc-N pCDNA3
7 HA MLC1-mCherry pCDNA3	68 A2AR <sup>flag</sup> - linkSG Gluc-C pCDNA3
8 mCherry-HA MLC1 pCDNA3	69 A2AR <sup>flag</sup> - link Cypet pCDNA3
9 MLC1-N Venus MLC1-C pCDNA3	70 A2AR <sup>flag</sup> - link Ypet pCDNA3
10 MLC1-N mCherry MLC1-C pCDNA3	71 D2R - 3xFlag pCDNA3
11 HA MLC1 link Venus pCDNA3	72 D2R - 3xHA pCDNA3
12 Venus linker HA MLC1	73 D2R - link Venus pCDNA3
13 HA MLC1 link mCherry pCDNA3	74 D2R - link Venus-N pCDNA3
14 mCherry linker HA MLC1 pCDNA3	75 D2R - link Venus-C pCDNA3
15 hMLC1-link Venus PCDNA3	76 D2R - link Gluc pCDNA3
16 Venus linker- hMLC1 pCDNA3	77 D2R - linkSG Gluc-N pCDNA3
17 hMLC1-link mCherry pCDNA3	78 D2R - linkSG Gluc-C pCDNA3
18 mCherry-linker hMLC1 pCDNA3	79 D2R - link Cypet pCDNA3
<b>EXPRESSION CLONES DE MLC1 PARA BIFC</b>	80 D2R - link Ypet pCDNA3
19 HA MLC1 link Venus-N pCDNA3	81 GabaBR1myc - 3xFlag pCDNA3
20 Venus-A link HA MLC1 pCDNA3	82 GabaBR1myc - 3xHA pCDNA
21 HA MLC1 link Venus-C pCDNA3	83 GabaBR1myc - link Venus pCDNA3
22 Venus-C link HA MLC1 pCDNA3	84 GabaBR1myc - link Venus-N pCDNA3
23 hMLC1 - link Venus-N pCDNA3	85 GabaBR1myc - link Venus-C pCDNA3
24 hMLC1 - link Venus-C pCDNA3	86 GabaBR1myc - link Gluc pCDNA3
<b>EXPRESSION CLONES DE MLC1 PARA FRET</b>	87 GabaBR1myc - linkSG Gluc-N pCDNA3
25 hMLC1 - link Cypet pCDNA3	88 GabaBR1myc - linkSG Gluc-C pCDNA3
26 hMLC1 - link Ypet pCDNA3	89 GabaBR1myc - link Cypet pCDNA3
<b>EXPRESSION CLONES DE MLC1 PARA BILC</b>	90 GabaBR1myc - link Ypet pCDNA3
27 HA MLC1link GLuc pCDNA3	91 GabaBR2 - 3xFlag pCDNA3
28 HA MLC1 link Gluc-N pCDNA3	92 GabaBR2 - 3xHA pCDNA
29 HA MLC1 link Gluc-C pCDNA3	93 GabaBR2 - link Venus pCDNA3
30 GLuc linker HA MLC1 pCDNA3	94 GabaBR2 - link Venus-N pCDNA3
31 Gluc-N linker HA MLC1 pCDNA3	95 GabaBR2 - link Venus-C pCDNA3
32 Gluc-C linker HA MLC1 pCDNA3	96 GabaBR2 - link Gluc pCDNA3
33 hMLC1 - link GLuc pCDNA3	97 GabaBR2 - linkSG Gluc-N pCDNA3
34 hMLC1 - linkSG GLuc-N pCDNA3	98 GabaBR2 - linkSG Gluc-C pCDNA3
35 hMLC1 - linkSG Gluc-C pCDNA3	99 GabaBR2 - link Cypet pCDNA3
36 GLuc linkerSG hMLC1 pCDNA3	100 GabaBR2 - link Ypet pCDNA3
37 Gluc-N linkerSG hMLC1 pCDNA3	101 zipper link Venus pCDNA3
38 Gluc-C linkerSG hMLC1 pCDNA3	102 zipper link Venus-N pCDNA3
<b>CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS DE MLC1 SALVAJE Y MUTANTES CON INSERCIÓN DE GLICOSILACIÓN</b>	103 zipper link Venus-C pCDNA3
39 HA MLC1 Haloop-LAT4 pCDNA3	104 zipper link Gluc-N pCDNA3
40 HA MLC1 Haloop-LAT4-S280L pCDNA3	105 zipper link Gluc-C pCDNA3
41 HA MLC1 Haloop-LAT4-S246R pCDNA3	106 zipper linkSG Gluc-N pCDNA3
42 HA MLC1 Haloop-LAT4-C326R pCDNA3	107 zipper linkSG Gluc-C pCDNA3
43 HA MLC1 Haloop-S27D pCDNA3	108 Mash link Gluc pCDNA3
44 HA MLC1 Haloop-S27A pCDNA3	109 Mash linkSG Gluc-N pCDNA3
45 HA MLC1 Haloop-S177AS181A pCDNA3	110 Mash delta hlh linkSG Gluc-N pCDNA3
46 HA MLC1 Haloop-S177DS181D pCDNA3	111 E47 linkSG Gluc-N pCDNA3
<b>EXPRESSION CLONES DE PEZ CEBRA</b>	112 Gluc-N LAT2 pCDNA3
47 zMLC1 Cherry pCDNA3	113 Gluc-C LAT2 pCDNA3
48 zMLC1 pCDNA3	114 Gluc-N 4F2hc pCDNA3
49 zMLC1 pCS2	115 Gluc-C 4F2hc pCDNA3
50 zMLC1 3xFlag pCDNA3	116 Gluc-N Trans.R pCDNA3
51 3xFlag pCDNA3	117 Gluc-C Trans.R pCDNA3
52 zHepaCAM A-3xFlag pCS2	
53 zHepaCAM A-esmGFP pCS2	
54 zHepaCAM B-3xFlag pCS2	
55 zHepaCAM B esmGFP pCS2	
56 zHepaCAM A G89S-3xFlag pCS2	
57 zHepaCAM A G89D-3xFlag pCS2	
58 zHepaCAM A D128N-3xFlag pCS2	
59 zCLC2 3xFlag pCS2	
60 zMLC1promoter-esmGFP pTol	

<b>EXPRESSION CLONES PROTEÍNAS CANDIDATAS</b>	<b>EXPRESSION CLONES RELACIONADOS CON CLCS</b>
118 ZO1 - 3xFlag pCDNA3	170 CIC-2 E211V 3xFlag pCDNA3
119 3xFlag - ZO1 pCDNA3	171 CIC-2 256A 3xFlag pCDNA3
120 ZO1 - 3xHA pCDNA3	172 CIC-2 H536F 3xFlag pCDNA3
121 3xHA-ZO1 pCDNA3	173 CIC-1 3xFlag pCDNA3
122 ZO1 link Gluc pCDNA3	174 CIC-1 TevN TevS1 GV pCDNA3
123 ZO1 linkSG Gluc-N pCDNA3	175 CIC-1 TevC pCDNA3 6.2 TK
124 ZO1 linkSG Gluc-C pCDNA3	176 CIC-5 TevN TevS1 GV pCDNA3
125 Gluc linker ZO1 pCDNA3	177 CIC-5 TevC pCDNA3 6.2 TK
126 Gluc-N linker ZO1 pCDNA3	<b>EXPRESSION CLONES DE ADENOVIRUS</b>
127 Gluc-C linker ZO1 pCDNA3	178 GlialCAM 3xFLag pADV
128 CIC-2 link GLuc pCDNA3	179 GlialCAM R92Q 3xFLag pADV
129 CIC2- linkSG Gluc-N pCDNA3	180 GlialCAM R98C 3xFLag pADV
130 CIC2- linkSG Gluc-C pCDNA3	181 GlialCAM S196Y 3xFLag pADV
131 Gluc linker CIC-2 pCDNA3	182 GlialCAM P148S 3xFLag pADV
132 Gluc-N linker CIC-2 pCDNA3	183 GlialCAM R92W 3xFLag pADV
133 Gluc-C linker CIC-2 pCDNA3	184 GlialCAM G89D 3xFLag pADV
134 3xFlag - CD9 pCDNA3	185 GlialCAM G89S 3xFLag pADV
135 3xHA - CD9 pCDNA3	186 GlialCAM D128N 3xFLag pADV
136 3xFlag - Claudin1 pCDNA3	187 GlialCAM deltaC 3xFLag pADV
137 GlialCAM - 3xHA pCDNA3	188 GlialCAM esmGFP pADV
138 GlialCAM - 3xFlag pCDNA3	189 3xFlag-rCIC-2 pADV
139 GlialCAM link Venus pCDNA3	190 rCIC-2 mCherry pADV
140 GlialCAM link venus-N pCDNA3	191 hCIC-2HA-CyepT pADV
141 GlialCAM link Venus-C pCDNA3	192 hMLC1-esmGFP pADV
142 GlialCAM esmGFP pCDNA3	193 HAMLIC1-P92S-HAloop pADV
143 GlialCAM link GLuc pCDNA3	
144 GlialCAM linkSG Gluc-N pCDNA3	
145 GlialCAM linkSG Gluc-C pCDNA3	
<b>EXPRESSION CLONES RELACIONADOS CON GLIALCAM</b>	
146 GlialCAM R92Q-3xFlag pCDNA3	
147 GlialCAM R98C 3xFLag pCDNA3	
148 GlialCAM S196Y 3xFLag pCDNA3	
149 GlialCAM P148S 3xFLag pCDNA3	
150 GlialCAM R92W 3xFLag pCDNA3	
151 GlialCAM G89D 3xFLag pCDNA3	
152 GlialCAM G89S 3xFLag pCDNA3	
153 GlialCAM D128N 3xFLag pCDNA3	
154 GlialCAM L23H 3xFLa pCDNA3	
155 GlialCAM W263X 3xFLa pCDNA3	
156 GlialCAM deltaC 3xFLag pCDNA3	
157 GlialCAM deltaExtrac. 3xFLag pCDNA3	
158 GlialCAM esmGFP pCDNA3	
159 GlialCAM R92Q-3xFlag pCS2	
160 GlialCAM R98C 3xFLag pCS2	
161 GlialCAM S196Y 3xFLag pCS2	
162 GlialCAM P148S 3xFLag pCS2	
163 GlialCAM R92W 3xFLag pCS2	
164 GlialCAM G89D 3xFLag pCS2	
165 GlialCAM G89S 3xFLag pCS2	
166 GlialCAM D128N 3xFLag pCS2	
167 GlialCAM 3xFLag pCDNA3 6.2 TK	
168 GlialCAM R92Q 3xFLag pCDNA3 6.2 TK	
169 GlialCAM R92W 3xFLag pCDNA3 6.2 TK	

(\*) Parte de las construcciones de los *Entry Clones* de los mutantes de *GLIALCAM* fueron realizados por mi compañero de laboratorio Xavier Capdevila (al igual que los *Expression Clones* usados en los ensayos de *split-TEV*).

Ejemplo de una construcción de una proteína de fusión (MLC1-Venus) mediante la tecnología de *Multisite Gateway Cloning* (Invitrogen).





# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Razonar y convencer, ¡qué difícil, largo y trabajoso!  
¿Sugestionar? ¡Qué fácil, rápido y barato!*

*Santiago Ramon y Cajal*

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el  
resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*



# **CAPÍTULO 1**

**Estudio de las vías de degradación  
de varias variantes de la proteína  
MLC1 que portan diferentes  
mutaciones presentes en pacientes  
con MLC.**





Estudios bioquímicos previos en el grupo mostraban que las proteínas que portaban mutaciones en *MLC1* presentaban niveles inferiores de proteína en la membrana plasmática en comparación con la proteína salvaje (Teijido et al., 2004). Esto sugería que estas variantes podían presentar una elevada tasa de degradación. Por esta razón, se quiso abordar el estudio de las posibles vías de degradación de dichas proteínas defectivas. Se quería esclarecer si el tránsito intracelular de éstas estaba alterado en comparación con la proteína salvaje.

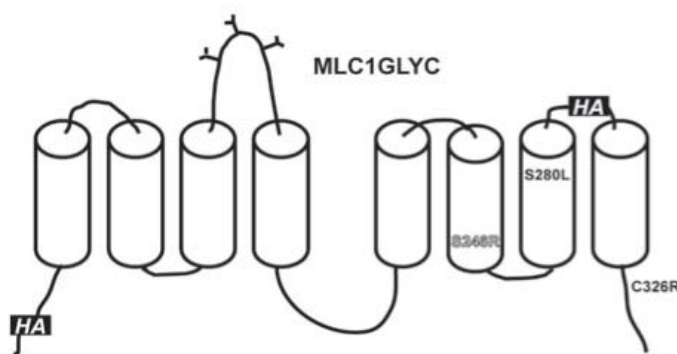
### **1. RETENCIÓN INTRACELULAR DE LAS VARIANTES PROTEICAS PORTADORAS DE MUTACIONES EN *MLC1*.**

El retículo endoplasmático (RE) es el primer punto de control de calidad de las proteínas. En él se cataloga si una proteína recién sintetizada está bien o mal plegada, permitiendo a la proteína que está plegada correctamente salir del RE y continuar su vía de exportación pasando por el complejo de Golgi. Aquí, la proteína va a terminar de adquirir las modificaciones post-traduccionales finales. Por el contrario, en el caso que la proteína no esté bien plegada, quedará retenida en el RE y posteriormente será retro-translocada al citosol para su degradación.

En el caso de las glicoproteínas, éstas terminan de adquirir su forma madura de glicosilación en el complejo de Golgi. Esto permite que se pueda determinar el compartimento subcelular en donde las glicoproteínas se localizan, monitorizando el estado de glicosilación de éstas por Western blot (WB). La proteína CFTR, la cual es defectiva en la fibrosis quística, es un prototipo de glicoproteína ampliamente estudiada, en la cual se ha

monitorizado su estado de glicosilación como una manera de seguir su procesamiento intracelular (Farinha et al., 2004).

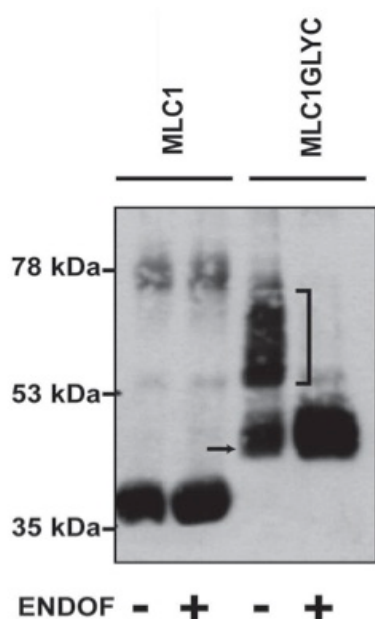
Quisimos realizar este tipo de análisis para MLC1. Sin embargo, MLC1 no está glicosilada a pesar de poseer una secuencia putativa de glicosilación entre los dominios putativos transmembranas 3 y 4 (Teijido et al., 2004). Para poder estudiar el tráfico de distintas proteínas portadoras de mutaciones en *MLC1*, se construyó una proteína quimérica, insertando en el sitio predicho de glicosilación del lazo extracelular, una secuencia de verdadera glicosilación (MLC1GLYC) procedente del transportador LAT4 (Bodoy et al., 2005) (Figura 30).



**Figura 30: Modelo esquemático 2D de la proteína reportera MLC1GLYC**, indicando el lazo altamente glicosilado de la proteína transportadora LAT4, añadido entre los dominios putativos transmembranas 3 y 4 de MLC1, la presencia de los dos epítipos HA y las distintas mutaciones estudiadas.

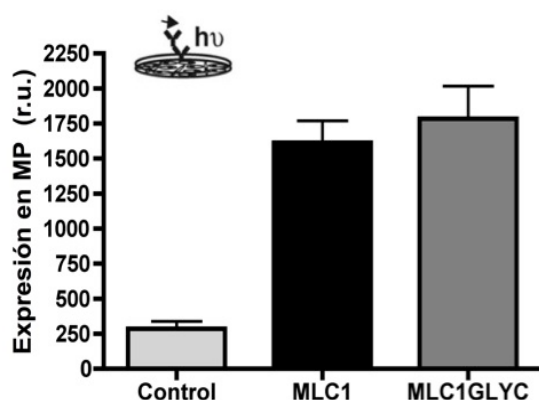
Quisimos primero estudiar si MLC1GLYC era capaz de glicosilarse. Para ello se procedió al tratamiento de MLC1 salvaje y MLC1GLYC con endoglicosidasa F (EndoF), enzima que corta glicanos, tanto de tipo rico en manosa como complejos ligados a asparagina, siendo por tanto capaz de eliminar la gran mayoría. Mientras que el tamaño de MLC1 salvaje no se alteraba después del tratamiento con EndoF, las bandas de mayor peso molecular de la proteína quimérica MLC1GLYC sí se veían reducidas, lo cual indica que MLC1GLYC sí está glicosilada (Figura 31, corchete). Una menor proporción de la proteína MLC1GLYC no veía afectado su tamaño después del

tratamiento con EndoF, indicando que esa fracción de la proteína no está glicosilada (Figura 31, flecha).



**Figura 31: MLC1GLYC está glicosilada.** Extractos de células HeLa transfectadas con MLC1 salvaje o MLC1GLYC fueron tratados con EndoF, enzima que corta glicanos del esqueleto proteico. No se observaron cambios en la movilidad de MLC1, lo que indica que MLC1 no está glicosilada. Por el contrario, en la proteína quimérica MLC1GLYC la movilidad de las bandas de mayor peso molecular se vieron reducidas (corchete), indicando que estaba glicosilada. La banda de menor peso molecular de MLC1GLYC (flecha) corresponde probablemente a una forma de la proteína no glicosilada. La banda de aproximadamente 78 kDa de MLC1 salvaje corresponde a la forma dimérica de la proteína.

Ya que no sabemos la función que MLC1 realiza, no podemos saber si la proteína MLC1GLYC es funcional. Sin embargo, podemos estudiar sus niveles en la membrana plasmática. Se pudo detectar MLC1GLYC en la superficie celular a través de experimentos de inmunodetección basados en luminiscencia (Figura 32), a niveles similares a como lo hacía la proteína MLC1 salvaje.



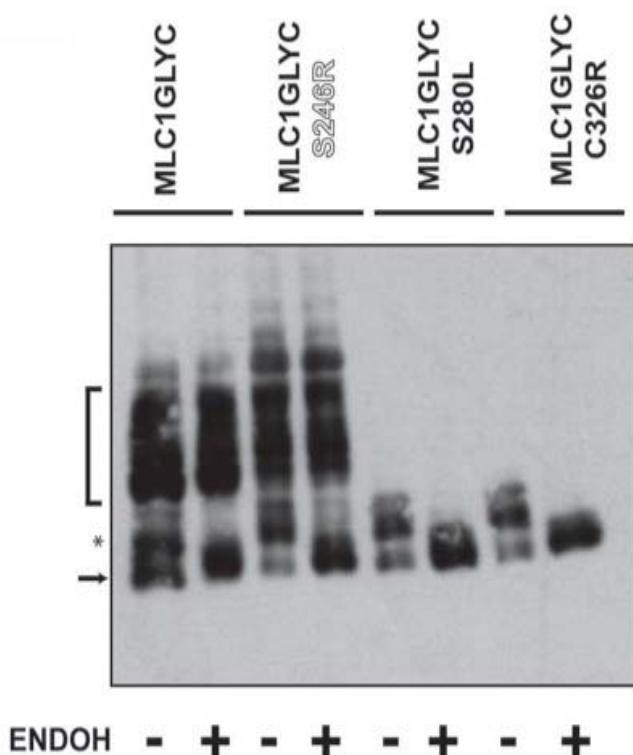
**Figura 32. Expresión de MLC1 y MLC1GLYC en la superficie de la membrana plasmática (MP).** Células HeLa fueron transfectadas con MLC1 salvaje o MLC1GLYC conteniendo dos epítopos HA y fueron analizadas usando un método basado en luminiscencia, gracias al epítipo HA extracelular, que permite la detección de la proteína en la membrana plasmática (ver Materiales y Métodos). Aquí se muestra el promedio de un experimento representativo (n=4 por cada condición). No hay diferencias significativas entre MLC1 y MLCYGLYC.

El siguiente paso fue medir la sensibilidad de MLC1GLYC a la endoglicosidasa H (EndoH), enzima altamente específica, capaz de cortar oligosacáridos ricos en manosas unidas a asparagina, pero no oligosacáridos complejos altamente procesados. Una proteína sensible a EndoH indica que no ha sido procesada en el Aparato de Golgi y que se encuentra en el RE.

Así, la mayor parte de la proteína MLC1GLYC era insensible a EndoH (Figura 33, corchete), lo cual indica que estaba totalmente procesada, y solamente una pequeña proporción de la proteína glicosilada era EndoH sensible (Figura 33, asterisco), indicando que es una forma residente en el RE.

A continuación, se procedió a introducir mutaciones específicas en la construcción MLC1GLYC (S246R, S280L y C326R). Se quiso determinar su estado de glicosilación, lo cual nos indicaría en qué compartimento intracelular se encontrarían (Figura 33).

Por un lado, observábamos que MLC1GLYC S246R presentaba un comportamiento muy similar a la proteína MLC1GLYC, ya que era prácticamente insensible a la EndoH. Por el contrario, las proteínas MLC1GLYC S280L o MLC1GLYC C326R no adquirirían un estado totalmente glicosilado (como ocurría en el caso de la construcción con la mutación S246R). En estas proteínas, la banda glicosilada era sensible al tratamiento con EndoH, lo cual indica que no eran capaces de alcanzar el compartimento de Golgi intermedio (Figura 33). Se podía sugerir entonces que las mutaciones S280L y C326R eran más severas que la S246R, puesto que las proteínas resultantes quedaban retenidas en el RE.



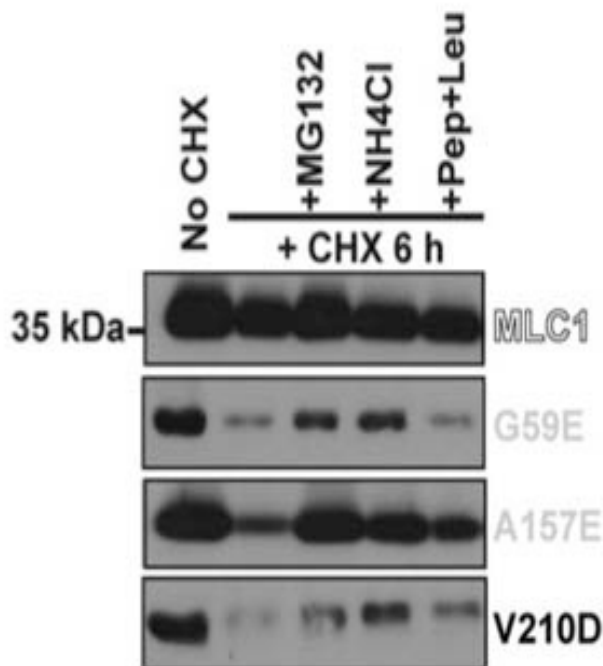
**Figura 33: Retención en el RE de las proteínas que contienen mutaciones en *MLC1*.** Extractos de células HeLa transfectadas con MLC1GLYC, MLC1GLYC S246R, MLC1GLYC S280L y MLC1GLYC C326R fueron procesados mediante la incubación con EndoH. Las bandas de mayor peso molecular (corchete) correspondientes a la parte de la proteína que estaba glicosilada no se vieron afectadas en MLC1GLYC y MLC1S246R después del tratamiento con EndoH. Por el contrario, estas bandas pesadas no estaban presentes en MLC1GLYC S280L y MLC1GLYC C326R. Solamente una banda más pequeña y de menor peso molecular (asterisco) fue observada en los mutantes S280L y C326R y que además era EndoH sensible. Estos resultados sugieren que estos mutantes están retenidos en el RE en su mayoría. La banda de menor peso molecular de MLC1GLYC (flecha) corresponde probablemente

a una forma de la proteína no glicosilada, ya que su movilidad no cambiaba después del tratamiento con EndoH o EndoF.

## 2. DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE PRESENTAN MUTACIONES EN *MLC1*.

Los experimentos anteriores sugerían que la mayoría de las proteínas con mutaciones en *MLC1* quedaban retenidas en el RE, donde probablemente serían dirigidas hacia el proteasoma para su degradación. Sin embargo, se observó que algunos mutantes podían parcialmente llegar a la membrana plasmática (Teijido et al., 2004). Para determinar cuáles eran las vías de degradación de estas proteínas, se llevó a cabo la medición de proteína remanente después de la incubación combinada de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteína), con un inhibidor del proteasoma (MG132), o de inhibidores lisosomales, como son el cloruro de amonio y la pepstatina+leupeptina (Figura 34). Estos inhibidores incrementaban los niveles

de la proteína con diferentes eficiencias. Así, los estudios de densitometría procedentes de 3 experimentos diferentes para las proteínas con las mutaciones G59E, A157E y V210D indicaban respectivamente que MG132 incrementaba los niveles de expresión de dichas proteínas un 22, un 31 y un 36% respectivamente; NH<sub>4</sub>Cl, un 21, un 32 y un 33%; y Pep+Leu, un 8, un 13 y un 9%. (Figura 34). Estos resultados apuntan a que tanto la vía de degradación del proteosoma asociada al RE como la del compartimento endo-lisosomal contribuyen a la degradación de las proteínas que portan mutaciones encontradas en MLC.

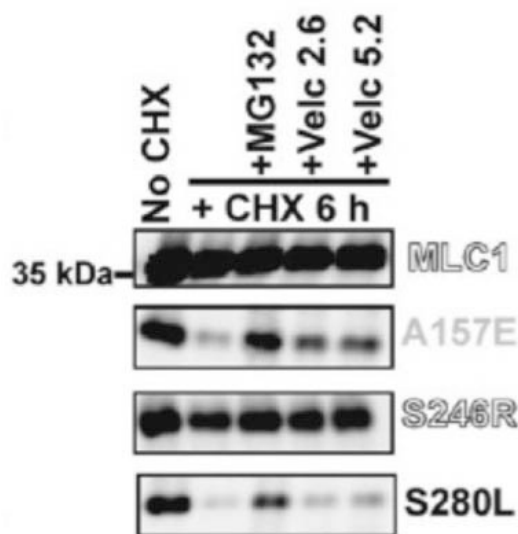


**Figura 34. Degradación lisosomal de las variantes mutantes de MLC1.** Células HeLa transfectadas con la proteína MLC1 salvaje o presentando las diferentes mutaciones indicadas, conteniendo todas ellas los epítotos HA, fueron incubadas 48 horas después de la transfección, con cicloheximida (CHX, 100 mg/ml), un inhibidor de la síntesis proteica, durante 6 horas y conjuntamente con un inhibidor del proteosoma, Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132, 50mM) o varios inhibidores lisosomales, como el cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl, 10mM) o pepstatina+leupeptina (Pep+Leu, 5mg/ml cada uno). Los estudios de densitometría procedentes de 3 experimentos diferentes para los mutantes G59E, A157E y V210D indican respectivamente que MG132 incrementa los niveles de expresión de los mutantes un 22, 31 y 36%; NH<sub>4</sub>Cl, un 21, 32 y 33%; y Pep+Leu, un 8, 13 y 9%. La detección de  $\beta$ -actina fue usada como control de carga (no mostrado).

### 3. ESTRATEGIAS QUÍMICAS PARA MEJORAR LA EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES PROTEICAS DEFECTIVAS EN MLC1.

Tras la observación de que la mayoría de los mutantes incrementaban su nivel de expresión tras el bloqueo de la degradación proteasomal, se exploró la posibilidad de usar un inhibidor proteasomal aprobado por la FDA

(*Food and Drug Administration*) como es el Velcade (bortezomib o PS-341), como posible aproximación farmacológica en estos pacientes (Bonuccelli et al., 2007). Como se muestra en la figura 35, la incubación con Velcade reducía parcialmente la degradación de un mutante intermedio como A157E (alrededor de un 25-40%) y de un mutante severo como S280L (entre un 5-15%), con una eficiencia más alta para el mutante intermedio A157E.



**Figura 35: Estrategias químicas para mejorar la expresión de los mutantes de MLC1.** Células HeLa transfectadas con MLC1 salvaje o los mutantes indicados conteniendo los *tags* HA fueron incubados 48 horas después de la transfección con el inhibidor de síntesis de proteína CHX (100 mg/ml) durante 6 horas y además, con el inhibidor proteasomal MG132 (50mM) o el compuesto aprobado por la FDA Velcade (bortezomib) (*Millennium Pharmaceuticals, Inc*) a 2,6 y 5,2 mM. A partir de 3 experimentos independientes, Velcade fue capaz de recuperar el nivel de expresión proteica en el mutante A157E alrededor de un 25-40%. Para el mutante S280L, la recuperación de la expresión fue entre un 5-15%. La detección de  $\beta$ -actina por WB fue usada como control de carga (no mostrado).

#### 4. DISCUSIÓN.

Todos los datos anteriores indican que la mayoría de las proteínas que contienen mutaciones en *MLC1* presentan un tráfico intracelular alterado y son retenidas en un compartimento intracelular, probablemente en el retículo endoplasmático, según muestran los resultados de la proteína que contiene lugares de glicosilación (MLC1GLYC). Al no tener función conocida para MLC1, no se puede determinar si MLC1GLYC es funcional, pero debido a que es capaz de llegar a la membrana plasmática, es posible usarla para seguir el tráfico intracelular de MLC1. Es probable que la retención en el RE sea consecuencia de un defecto de plegamiento causado por las mutaciones.



Algunas de las variante mutantes también son degradadas a través de los lisosomas, lo que apoya la hipótesis que existe otro control de calidad para regular la correcta conformación de las proteínas, además del que ya se establece en el RE.

Se sugiere que las mutaciones de *MLC1* estén afectando a la conformación de la proteína ya que se han realizado estudios donde usando chaperonas químicas como el glicerol se recuperaba parte de la expresión de las proteínas que contenían mutaciones en *MLC1* (Duarri et al., 2008). Asimismo, si se disminuía la temperatura (de 37°C a 33°C), la expresión de estas proteínas defectivas también aumentaba, sugiriendo esto que probablemente las mutaciones de *MLC1* están afectando al correcto plegamiento de la proteína, dando lugar por tanto a una mayor tasa de degradación tanto por la vía del proteosoma como la asociada a los lisosomas. Esta afectación de la correcta conformación proteica ocurre también en otras enfermedades genéticas.

Lo que quisimos estudiar por tanto fue si éramos capaces de rescatar parte de la expresión de tales proteínas usando una serie de inhibidores de la maquinaria de degradación (tanto del proteosoma como de los lisosomas) con el fin de restaurar los niveles de dichas proteínas, así como mejorar su tráfico a la membrana plasmática. Esta estrategia ha sido usada en otras enfermedades como posibilidad terapéutica. Sin embargo, dado que la función de *MLC1* es desconocida, tal vez esta aproximación podría no ser suficiente, ya que las proteínas defectivas en *MLC1* podrían no ser funcionales (aunque mejoren su tráfico a la membrana plasmática).

El no disponer de datos clínicos detallados para los pacientes de MLC y la alta variabilidad fenotípica que existe entre los mismos, incluso aquellos que presentan una misma mutación, limita el poder establecer correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el fenotipo de cada paciente, a pesar que entre las mutaciones estudiadas se pueden observar diferentes grados de afectación de la proteína.



# **CAPÍTULO 2**

**Identificación y análisis del  
interactoma de MLC1.**



## 1. INTRODUCCIÓN

El desconocimiento de la función que desempeña MLC1 hace difícil entender el mecanismo patofisiológico de la enfermedad, y por tanto, no se han podido desarrollar terapias para los pacientes afectados. Por eso, el conocer la red proteica con la cual MLC1 puede estar interaccionando nos puede permitir comprender qué papel fisiológico estaría llevando a cabo. Éste es el objetivo principal de esta Tesis y en el que más tiempo y esfuerzo se ha invertido.

La mayoría de las proteínas median su función dentro de complejas redes de macromoléculas interconectadas (Cusick et al., 2005). Es por ello que las interacciones proteína-proteína son esenciales para casi todos los procesos celulares. Por eso, identificar, cuantificar, localizar y modelar las redes de interacción entre proteínas es un requisito clave para entender las bases biofísicas de todos los procesos celulares (Morsy et al., 2008). Las dos metodologías más utilizadas para mapear interacciones entre proteínas son: el sistema doble híbrido en levadura (Y2H), y la inmunopurificación por afinidad (AP) seguida de espectrometría de masas (MS) (Cusick et al., 2005), (Morsy et al., 2008), (Williamson and Sutcliffe).

El sistema de doble híbrido en levadura (Fields and Song, 1989) explota la naturaleza de los factores de transcripción, que contienen sitios de unión al ADN y dominios de activación. Cuando estos dominios están separados, el factor de transcripción no es funcional. Sin embargo, si cada dominio es fusionado a dos proteínas que interaccionan, la función del factor puede ser restaurada para transcribir uno o más genes reporteros que nos permitirán seleccionar el evento de interacción (Morsy et al., 2008). Es un método usado

comúnmente para identificar interacciones binarias entre proteínas (Cusick et al., 2005).

Por otra parte, la inmunopurificación por afinidad (AP) seguida de espectrometría de masas (MS) se suele llevar a cabo para mapear miembros de complejos proteicos, identificando interacciones directas mezcladas con un alto número de asociaciones indirectas entre proteínas (Williamson and Sutcliffe, 2010). El complejo purificado puede entonces ser analizado por SDS/PAGE e identificado por Western blot o más comúnmente por MS.

## **2. IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS.**

Se obtuvieron un conjunto de proteínas candidatas en cada una de las técnicas utilizadas para tratar de identificar el interactoma de MLC1. Por un lado, se realizaron técnicas genéticas, basándonos en la metodología del doble híbrido *split-ubiquitin* usando los servicios de la compañía Dualsystems; y por otro lado proteómicas, en colaboración con la empresa Logopharm.

### **2.1 Candidatos obtenidos mediante el sistema *split-ubiquitin* DUALmembrane.**

El sistema *DUALmembrane* permite la investigación de interacciones proteína-proteína entre proteínas de membrana, cosa que no permitía el sistema de doble híbrido clásico. Se basa en la reconstitución de la ubiquitina. Ésta es dividida en dos mitades, a las cuales se les fusiona las proteínas de interés. Cuando estas mitades se expresan separadamente dentro de una célula, éstas permanecen plegadas de tal manera que no son reconocidas por las proteasas de ubiquitina específicas (UBPs), pero si las co-expresamos

dentro de la misma célula y las proteínas de interés están lo suficientemente próximas, dichas proteínas forzarán a las dos mitades a estar muy cerca, permitiéndolo su re-ensamblaje y siendo posible entonces que sea reconocida y cortada por las UBPs. Por tanto, necesitamos disponer de dos vectores protagonistas: el cebo (*bait*) y la presa (*prey*). El cebo se construyó fusionando a la parte C-terminal de MLC1, la parte C terminal de la ubiquitina y el factor de transcripción GAL4VP16 (vector pBT3-N; P03230). La presa se construyó fusionando la parte N-terminal de la ubiquitina a una librería de cerebro (vector pPR3-N; P03234). La interacción entre el cebo y la presa dará lugar al re-ensamblaje de las dos mitades de la ubiquitina. Entonces, las UBPs presentes en la levadura cortarán el factor de transcripción presente en el cebo. Éste se dirigirá al núcleo y activará los genes reporteros en el genoma de la levadura. Por tanto, la interacción que tiene lugar en la membrana es entonces convertida en actividad del gen reportero. Normalmente, los genes reporteros son marcadores auxotróficos, los cuales permiten una selección sobre un medio mínimo o reporteros coloreados como el lacZ. En nuestro caso eran leupeptina, histidina, triptófano y  $\beta$ Gal.

Tras el *screening* genético realizado por *Dualsystems*, se obtuvieron 104 clones positivos, los cuales la empresa nos envió el cultivo de levadura de cada uno de ellos para que pudiéramos recuperar el DNA. Así, se procedió al aislamiento del DNA que llevaba incorporado la levadura y luego, se procedió a transformarlo en bacterias *E. Coli*, con el fin de obtener mayor cantidad de DNA y de mejor calidad. Una vez el DNA era obtenido de la bacteria, éste era cuantificado y digerido con la enzima de restricción Sfil para comprobar que algún inserto era liberado (nuestro vector presa pPR3-N presentaba una diana



para Sfil). En aquellos casos donde se liberaba inserto, se procedía a realizar una reacción de secuenciación, y posteriormente, si la secuencia mantenía la pauta de lectura y codificaba para una proteína, la secuencia se analizaba comparando el grado de homología con otras secuencias de una base de datos mediante el programa *BLAST*.

De todos los clones analizados, obtuvimos 4 posibles clones positivos: SERP1 (proteína de estrés asociada al retículo endoplasmático 1), CD9, una tetraspanina típica de uniones, MBP (proteína básica de la mielina) y CASQ1 (calsecuestrina 1). La empresa *DualSystems* volvió entonces a comprobarlos. Tras la comprobación, sólo se revalidaron dos: SERP1 (Yamaguchi et al., 1999) y CD9 (Schmidt et al., 1996; Kagawa et al., 1997; Deissler et al., 2007).

## **2.2 Candidatos obtenidos mediante técnicas proteómicas.**

Los estudios de proteómica se llevaron a cabo con la colaboración de la empresa *Logopharm*, combinando técnicas de purificación por afinidad con métodos de proteómica cuantitativa basados en cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS).

Durante el proceso de esta Tesis, la misma empresa *Logopharm* ha ido mejorando sus técnicas para la identificación de proteínas que forman parte de un interactoma. Así, cuando nosotros empezamos a colaborar con ellos, lo primero que obtuvimos fue una lista de proteínas candidatas obtenidas a partir de la de solubilización de membranas de cerebros de rata y ratón con una mezcla de detergentes determinada, denominada *complexolyte 82*. Se realizaron co-inmunoprecipitaciones a partir de cerebros solubilizados, utilizando un conjunto de 4 anticuerpos diferentes contra MLC1. Posteriormente se analizó por LC-MS cuáles eran las proteínas que estaban asociadas con

MLC1. Nosotros esperábamos que en dicha lista apareciera alguna proteína que ya habíamos obtenido por los métodos genéticos, pero no fue el caso. Por ello, decidimos ampliar nuestra colaboración con la empresa *Logopharm*. Les pedimos que repitieran las inmunoprecipitaciones usando otros tipos de detergentes, en condiciones más suaves, para intentar aumentar nuestras posibilidades de éxito. En esta segunda ronda se realizaron purificaciones por afinidad, solubilizando membranas de cerebro de rata y ratón con la mezcla de detergentes *complexolite 82* (el usado anteriormente) y *complexolite 47a*. Las condiciones de solubilización no afectaron a la purificación de MLC1. Dicho análisis confirmaba que el anticuerpo contra el extremo N-terminal (el 154) mostraba la mayor eficiencia de purificación, lo cual no significaba que diera los candidatos de interacción más creíbles. En la tabla siguiente podemos ver un resumen de las proteínas encontradas tras esta segunda ronda de purificación así como las encontradas en la primera ronda (Tabla 3).

Protein	gi	MW [kDA]	MLC1 N-term 154 - 47a	MLC1 N-term 155 - 47a	MLC1 hN-term - 47a	MLC1 N-term 154 - 82	MLC1 N-term 155 - 82	MLC1 hN-term - 82	MLC1 N-term 154 - 82	MLC1 N-term 155 - 82	MLC1 C-term - 82
MLC1	gj 157823887	44	1,25	0,56	0,77	1,45	0,77	0,64	1,07	0,68	0,48
phosphodiesterase 2A	gj 13592021	105	0,000	0,010	0,000	0,029	0,010	0,029	0,124	0,095	0,019
NBC-like1	gj 9437326	123	0,130	0,049	0,016	0,211	0,146	0,033	0,106	0,081	0,024
Furry-homolog-like	gj 119964716	337	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,042	0,030
ZO-1	gj 6678355	195	0,051	0,005	0,005	0,031	0,000	0,000	0,051	0,036	0,000
ZO-2	gj 160333863	131	0,015	0,000	0,031	0,000	0,015	0,015	0,015	0,031	0,000
FATP-1	gj 2492888	72	0,000	0,000	0,000	0,014	0,042	0,000	0,028	0,042	0,056
HepaCAM	gj 56790921	46	0,435	0,152	0,304	0,000	0,000	0,000	0,065	0,043	0,000
Reticulocalbin 2	gj 4506457	37	0,000	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
tweety homolog 1	gj 149016622	33	0,091	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Reticulon-3	gj 5174655	26	0,115	0,077	0,000	0,077	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
Reticulon-4 (Nogo-A)	gj 13929188	126	0,032	0,111	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,079	0,000
Reticulon-1	gj 45827776	24	0,167	0,292	0,000	0,000	0,083	0,000	0,125	0,125	0,000
Highaff Glutamate transporter GLT	gj 10121878	62	0,161	0,000	0,000	0,226	0,097	0,065	0,129	0,097	0,032
N-cadherin (2)	gj 115424	100	0,000	0,000	0,040	0,000	0,010	0,060	0,000	0,020	0,020
coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	gj 149065216	27	0,000	0,000	0,000	0,111	0,037	0,074	0,074	0,037	0,037
Oligodendrocyte glycoprotein	gj 2497314	28	0,000	0,000	0,000	1,179	0,036	0,214	0,679	0,143	0,071
hexokinase	gj 309289	102	0,000	0,000	0,000	0,069	0,059	0,029	0,000	0,000	0,000
UDP-glucose pyrophosphorylase	gj 67078526	57	0,439	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,070	0,000	0,000
LOC67306 or T03G11.3	gj 157817901	35	0,000	0,114	0,000	0,000	0,229	0,000	0,057	0,286	0,000
CICC1 ( CLIC-like chloride channel)	gj 115495191	62	0,000	0,032	0,000	0,000	0,081	0,000	0,000	0,129	0,000
cAMP-regulated GEF II (GEF4)	gj 4115909	115	0,000	0,017	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,052	0,000

**Tabla 3: Descripción de los resultados obtenidos tras la purificación por afinidad de MLC1 (los valores indican abundancia).** Los 3 anticuerpos usados son: 2 anticuerpos contra el extremo N-terminal de la proteína de ratón (154 y 155) y otro anticuerpo contra el extremo N-terminal de la proteína MLC1 humana (NH). La primera ronda de purificación usando el complexiolite 82 se representa en las 3 últimas columnas. La segunda ronda se llevó a cabo con los detergentes complexiolite 82 y complexiolite 47 a. Se representan en las 6 primeras columnas.

Verde: consistencia total (encontrada específicamente en al menos 5 de 9 purificaciones).

Azul: encontrado con la mayoría de los anticuerpos usando complexiolite 82.

Rojo-anaranjado: encontrado con la mayoría de los anticuerpos usando complexiolite 47 a.

Amarillo: encontrado consistentemente pero solo con un anticuerpo.

Los candidatos más significativos identificados por LC-MS teniendo en cuenta todas las rondas de solubilización fueron:

- La fosfodiesterasa 2A (PDE2A): en la segunda ronda se obtuvieron cantidades más bajas que en la primera ronda, pero se confirmaba con todos los anticuerpos (no se encontró con complexiolite 47a).
- El co-transportador de sodio-bicarbonato (NBC-like 1): se detectaron cantidades altas en la 2ª ronda, y se confirmó con todos los anticuerpos y todas las condiciones.
- ZO-1 y ZO-2: se confirmaron en la 2ª ronda (con los anticuerpos contra el N-terminal).
- HepaCAM: se encontró poca cantidad en la primera ronda con el complexiolite 82, pero tras la segunda ronda, se obtuvieron cantidades relativamente altas con todos los anticuerpos usando el complexiolite 47a.
- Reticulones (1, 4 y 3): en la primera ronda no se detectaron, pero sí en la segunda. Se obtuvieron mayores cantidades con los anticuerpos contra el N-terminal, y más cantidad con el complexiolite 47a.
- El transportador de glutamato: se detectaron cantidades relativamente altas con todos los anticuerpos, pero más con el complexiolite 82.

De esta manera, obtuvimos una lista de proteínas candidatas, de las cuales consideramos como más interesantes las proteínas fosfodiesterasa 2A (PDE2A), el cotransportador de sodio-bicarbonato (NBC), la proteína de uniones tipo *tight* ZO-1, la molécula de adhesión HepaCAM, el transportador de glutamato GLT1 y el putativo canal de cloruro Tweety1.

Con el tiempo, durante la realización de la presente Tesis, la empresa Logopharm mejoró sus softwares y métodos de análisis. Decidimos entonces

realizar un estudio de correlación cuantitativa proteómica. Así, encontramos que MLC1 era la proteína más abundantemente purificada (como esperábamos) y que HepaCAM era la segunda proteína más abundante y que específicamente co-purificaba con MLC1 tras todas las co-inmunoprecipitaciones realizadas (y usando 3 anticuerpos diferentes) (Tabla 4).

Protein Name	rb47 N1	rb47 N2	rb47 IgG	mb47 NH	mb47 IgG	Sort-Criterion Korrelation
<b>Membrane protein MLC1</b>	<b>124569</b>	<b>38052</b>	<b>0</b>	<b>360969</b>	<b>0</b>	<b>1,000</b>
Hepatocyte cell adhesion molecule	46767	30938	0	87541	0	<b>0,958</b>
Syntaxin-binding protein 1	811	4186	71	4391	0	<b>0,636</b>
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	1355	999	41	1036	81	<b>0,582</b>
Ubiquitin	35919	55782	0	45057	4746	<b>0,534</b>
Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	17989	17122	153	12130	1131	<b>0,420</b>
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	2148	614	0	805	157	<b>0,371</b>
Excitatory amino acid transporter 2	7126	3079	0	2344	0	<b>0,302</b>
Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	12523	3316	0	1664	436	<b>0,130</b>
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	38217	3034	668	2034	151	<b>0,099</b>
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	620	2337	0	709	0	<b>0,066</b>

Tabla 4: Abundancia específica encontrada tras las purificaciones con 3 anticuerpos diferentes contra MLC1.

### 3. PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍA PARA VALIDAR INTERACCIONES ENTRE MLC1 Y POSIBLES CANDIDATOS.

#### 3.1 Introducción.

Una vez obtenidas las proteínas candidatas a formar parte del interactoma de MLC1 era necesario disponer de una metodología robusta que permitiera la validación de verdaderas interacciones entre proteínas. La primera aproximación que se llevó a cabo para validar la interacción entre MLC1 y alguna de las proteínas candidatas de nuestra lista fue hacer estudios de co-inmunolocalización así como estudios de co-inmunoprecipitación usando anticuerpos comerciales (contra las proteínas candidatas). Aquí nos encontramos con graves dificultades, ya que la mayoría de las veces los anticuerpos comprados no funcionaban, resultando imposible validar las

interacciones de esta manera. Debido a ello, se optó por la clonación de los genes identificados usando la metodología de *Multisite Gateway* de *Invitrogen*, que permite una alta eficiencia de clonación. Asimismo, se decidió desarrollar diferentes metodologías que nos pudieran permitir re-validar las interacciones entre MLC1 y las proteínas candidatas. Sin embargo, fue preciso poner a punto dichas técnicas con proteínas control para poder discernir entre lo que son verdaderas interacciones de las que no. Una vez la interacción fuera confirmada por alguna de las metodologías empleadas, se podría proceder a una validación funcional de dichas interacciones, pudiendo obtener información importante acerca de la función de MLC1, así como validar si pueden estar actuando como posible gen responsable de la enfermedad.

Los principales métodos que se decidieron implementar fueron:

► la adición de epítomos *tags* a las proteínas candidatas para así poder desarrollar ensayos de co-inmunoprecipitación y co-inmunofluorescencia y comprobar así si ambas proteínas están interaccionando o no.

► métodos basados en la complementación de fragmentos de proteína, como son la complementación bimolecular de fluorescencia (*BiFC*) y la complementación bimolecular de luminiscencia (*BiLC*).

Para poner a punto cada metodología de detección de interacción entre proteínas y tener un conocimiento óptimo de cada una de ellas antes de utilizarlas con las proteínas candidatas, se utilizaron un conjunto de proteínas control. Se eligieron dos receptores acoplados a proteína G por ser proteínas con varios pasos transmembrana (con topología similar a MLC1): el receptor de adenosina A<sub>2</sub>AR y el receptor de dopamina D<sub>2</sub>R. El receptor de adenosina A<sub>2</sub>A es capaz de homodimerizar (Canals et al., 2004). Además, también puede

heterodimerizar con el receptor de dopamina (Canals et al., 2003). Asimismo, el receptor D<sub>2</sub> de dopamina también es capaz de formar dímeros (Ng et al., 1996), (Zawarynski et al., 1998). Estas interacciones se han considerado controles positivos de interacción. Por otra parte, MLC1 también es capaz de dimerizar (Teijido et al., 2004), por lo que también ha sido usada como proteína control en los diferentes métodos de interacción.

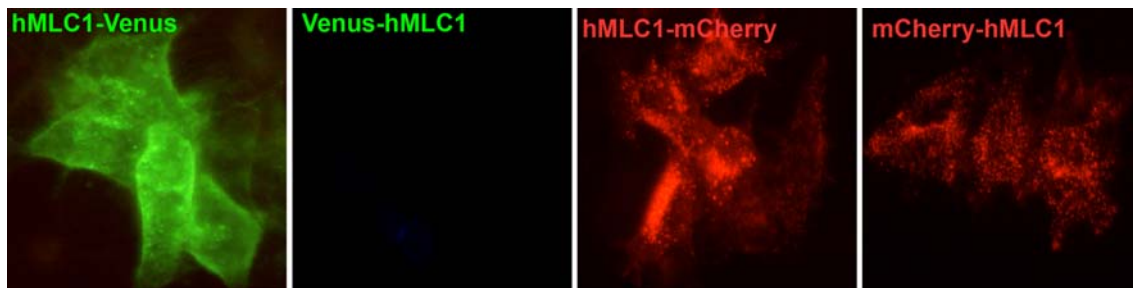
### **3.2 Métodos de complementación de fragmentos de proteína.**

En los métodos basados en la complementación de fragmentos de proteína, dos proteínas de interés son fusionadas a fragmentos complementarios de una proteína reportera. Si las proteínas interactúan, los fragmentos se encuentran y pliegan según la estructura nativa y la actividad del gen reportero es reconstituida (Remy and Michnick, 2007), (Kerppola, 2006a; Kerppola, 2006b; Kerppola, 2006c), (Remy and Michnick, 2006). A lo largo de esta Tesis se han optimizado en el laboratorio las técnicas de complementación bimolecular de fluorescencia (*BiFC*) y la complementación bimolecular de luminiscencia (*BiLC*).

#### **3.3.1 *BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)*.**

Para la realización de la complementación bimolecular de fluorescencia (Kerppola, 2008a; Kerppola, 2008b), (Ciruela, 2008) se utilizó como proteína fluorescente reportera la proteína Venus, que es una versión mejorada de la proteína fluorescente amarilla YFP (Nagai et al., 2002). La proteína Venus fue dividida a la mitad en dos fragmentos: Venus-N (correspondiente a los aminoácidos 1 al 156 ) y Venus-C (aminoácidos 157 al 239). Utilizando la

metodología del sistema *Multisite Gateway Cloning* (Invitrogen) se fusionó a la región C-terminal de las proteínas control las dos mitades de la proteína Venus. En el caso de MLC1 la fusión de Venus también se llevó a cabo en el C-terminal. Esto fue así, porque previamente se testaron diferentes proteínas de fusión con diferentes proteínas fluorescentes y distintas conformaciones. Resultó que el caso más viable fue aquél en el cual se fusionaba la proteína fluorescente Venus a la parte C-terminal de MLC1, ya que entonces, éramos capaces de detectar MLC1 en la membrana plasmática (Figura 37).



**Figura 37: Diferentes fusiones de proteínas fluorescentes a MLC1.** Células HeLA fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas, las células fueron observadas en un microscopio Leica de fluorescencia. En el caso de la fusión de Venus, sólo se observó fluorescencia cuando la proteína fluorescente estaba fusionada en el C-terminal de MLC1. Además, la proteína era capaz de alcanzar la membrana plasmática. En el caso de la proteína fluorescente mCherry, se detectó fluorescencia cuando se fusionaba en ambos extremos de MLC1. Sin embargo, la proteína no era capaz de llegar a la membrana plasmática y quedaba retenida intracelularmente. (N=2)

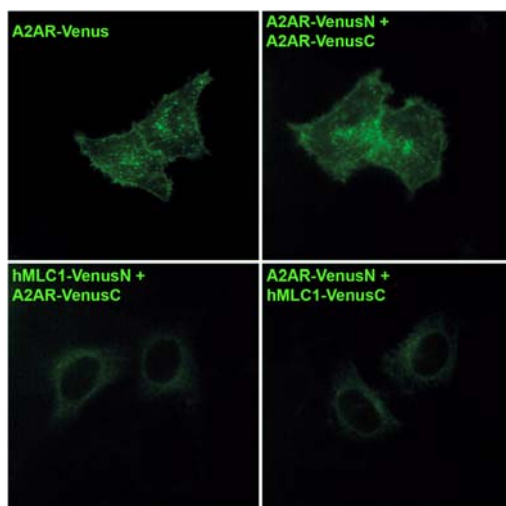
Por la metodología de *BiFC* se consiguió observar la fluorescencia reconstituida para la proteína MLC1, que ya se sabía que era capaz de homodimerizar (Figura 38).





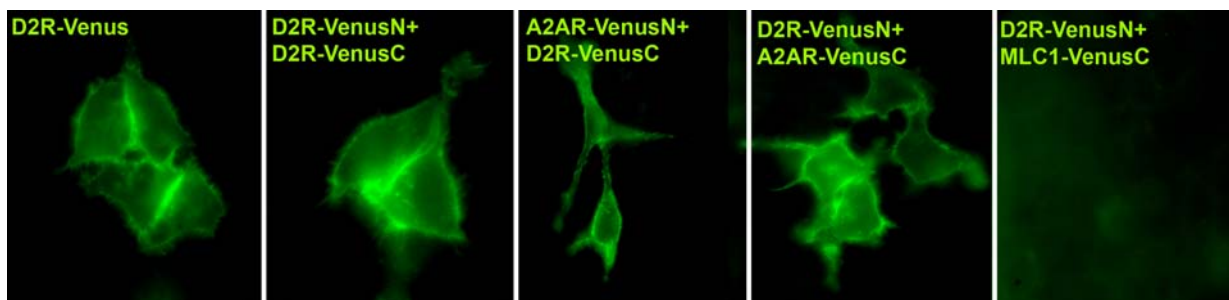
**Figura 38: Detección de la homodimerización de MLC1 mediante la técnica de *BiFC*.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas, las células fueron observadas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Nótese que no se observó fluorescencia en las células cuando las mitades de Venus fueron transfectadas solas. (N=4)

Posteriormente, se procedió a probar si éramos capaces de detectar la homodimerización del receptor de adenosina  $A_2$ . En este caso, quisimos usar como control negativo de interacción la combinación entre MLC1 y  $A_2AR$  (Figura 39). Se pudo reproducir la dimerización de  $A_2AR$ , detectándose señal en la membrana plasmática. No obstante, también se detectó cierto grado de fluorescencia en el caso de la hetero-interacción entre MLC1 y  $A_2AR$ , que en principio era considerada como negativa. Aún así, la intensidad de fluorescencia era menor y además, la señal era detectada casi exclusivamente en el retículo endoplasmático (RE) y no en la membrana plasmática. Esto podría ser considerado como una señal inespecífica, puesto que al sobreexpresar, es posible que estas dos proteínas, aunque realmente no interaccionen, pudieran encontrarse en el RE.



**Figura 39: Homodimerización del receptor de adenosina  $2A$  mediante *BiFC*.** Células HeLa fueron transfectadas con las correspondientes construcciones. Tras 48 horas, la fluorescencia fue detectada en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. La transfección de las proteínas con ambas mitades de Venus por separado no mostraban fluorescencia (no mostrado). Puede observarse la dimerización de  $A_2AR$  y la detección de la fluorescencia en la membrana plasmática. También pudo observarse cierto nivel de fluorescencia en el caso de la interacción usada como control negativo, aunque ésta se localizaba predominantemente en el retículo endoplasmático. (N=4)

Una vez probadas dichas homo-interacciones (MLC1-MLC1, A<sub>2</sub>AR-A<sub>2</sub>AR), quisimos estudiar si éste era un buen método para detectar hetero-interacciones. Para ello, decidimos probar la interacción ya descrita entre el receptor A<sub>2</sub> de adenosina y el receptor de dopamina D<sub>2</sub>R. Así, se pudo detectar la dimerización del receptor de dopamina D<sub>2</sub>R por *BiFC*, así como la hetero-interacción entre A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R en las dos conformaciones posibles (Figura 40).

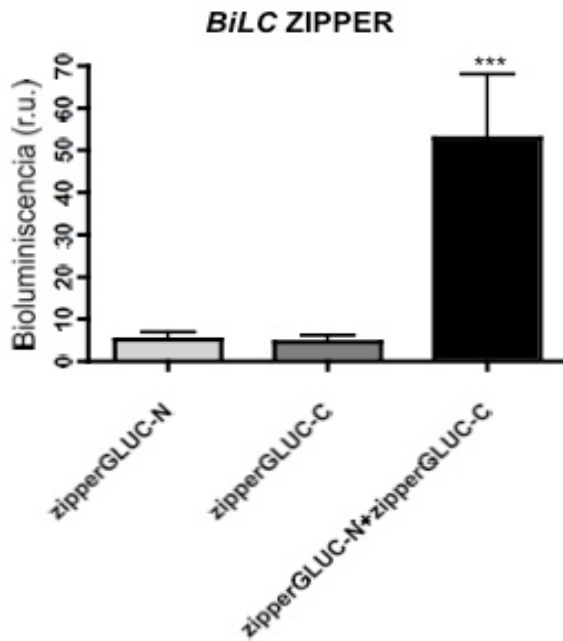


**Figura 40: Dimerización del receptor D<sub>2</sub> de dopamina y hetero-interacción entre los receptores D<sub>2</sub>R y A<sub>2</sub>AR por *BiFC*.** Células HeLa fueron transfectadas con las correspondientes construcciones. Tras 48 horas, la fluorescencia fue detectada en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. La transfección de las proteínas con ambas mitades de Venus por separado no mostraban fluorescencia (no mostrado). Pudo detectarse la interacción entre D<sub>2</sub>R-D<sub>2</sub>R, y entre D<sub>2</sub>R y A<sub>2</sub>AR en las dos conformaciones posibles. No se observa señal cuando se estudia la interacción considerada negativa entre D<sub>2</sub>R y MLC1. (N=2)

### 3.3.3 *BiLC (Bimolecular Luminescence Complementation)*.

En el método de *BiLC* se ha utilizado la *Gaussia luciferasa* (GLuc) humanizada como proteína reportera. GLuc es una proteína monomérica de 185 aminoácidos procedente del copépodo marino *G.princeps*, que cataliza la oxidación del sustrato colenterazina en una reacción que emite luz azul a 480nm (Tannous et al., 2005), (Kim et al., 2009), (Remy and Michnick, 2006). Para llevar a cabo el método de *BiLC* se fusionaron ambos fragmentos de la proteína GLuc (dividida del aminoácido 1 al 93; y del 94 al 179) al extremo C-terminal de las proteínas control anteriormente citadas. En el caso de MLC1, los fragmentos se fusionaron en las dos orientaciones posibles.

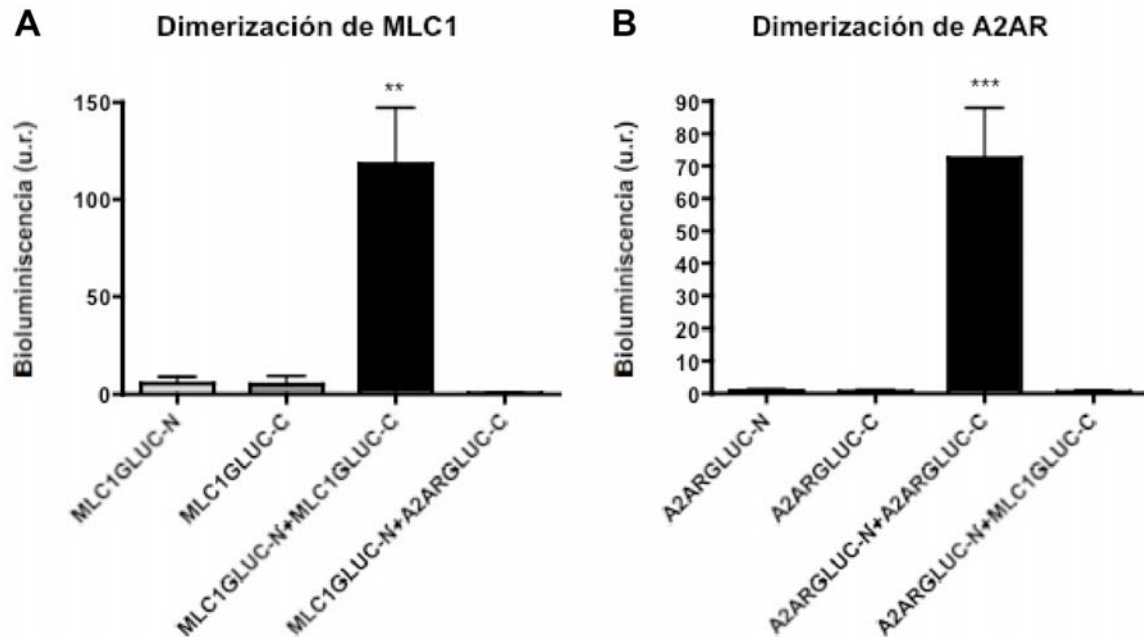
El método se empezó a testar con la proteína zipper (cremallera de leucina de un activador transcripcional de levadura GCN4 (zipper), capaz de homodimerizar (O'Shea et al., 1991)), puesto que fue la usada por el creador del método (S. W. Michnick) (Figura 41).



**Figura 41: Dimerización de zipper por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Pudimos detectar la dimerización de zipper. N=7. \*\*\*p<0,001 Test de comparación múltiple de Bonferroni.

Una vez fuimos capaces de reproducir el método en el laboratorio quisimos ponerlo a punto usando las proteínas control anteriormente citadas para la metodología de *BiFC*. De esta manera seríamos capaces de establecer un umbral por encima del cual consideraríamos que estaba ocurriendo interacción y por debajo del cual diríamos que sería interacción inespecífica. Esto nos daría seguridad para creernos esta metodología cuando tuviéramos que utilizarla con las proteínas candidatas que quisiéramos testar.

Las primeras interacciones que quisimos estudiar fueron la homodimerización de MLC1, la homo-dimerización del receptor de adenosina A<sub>2</sub>AR y la no interacción entre MLC1 y A<sub>2</sub>AR (Figura 42).

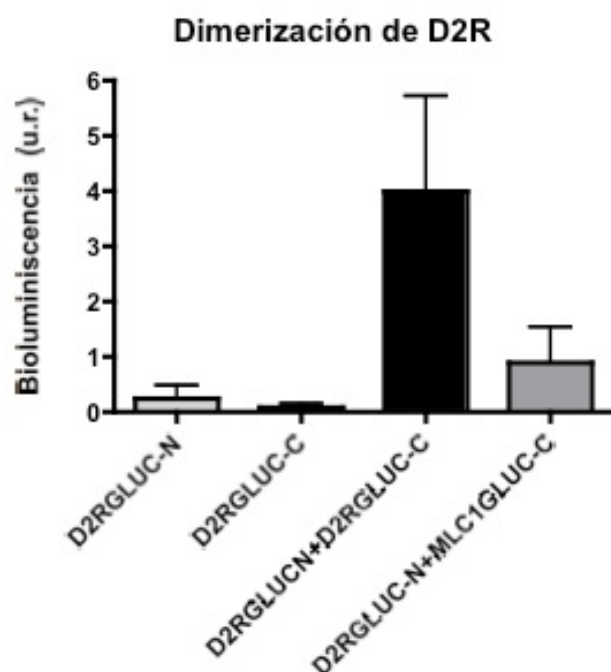


**Figura 42: Dimerización de MLC1 y A<sub>2</sub>AR por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. **A**, Dimerización de MLC1. No se detectó interacción entre MLC1 y A<sub>2</sub>AR. \*\* p <0,01 entre MLC1-MLC1 y MLC1-A<sub>2</sub>AR. **B**, Dimerización de A<sub>2</sub>AR. No se detectó bioluminiscencia cuando se cotransfectaron A<sub>2</sub>AR y MLC1. \*\*\*p<0,001 entre A<sub>2</sub>AR-A<sub>2</sub>AR y A<sub>2</sub>AR-MLC1. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. Interacción MLC1-MLC1, N=14. Interacción MLC1-A<sub>2</sub>AR, N=5. Interacción A<sub>2</sub>AR-A<sub>2</sub>AR, N=13. Interacción A<sub>2</sub>AR-MLC1, N=10.

Es importante destacar que la actividad que se puede detectar cuando se co-transfectan las dos mitades de la luciferasa para la complementación bimolecular de luminiscencia está como máximo, en torno al 10% de la actividad que se puede detectar cuando se transfecta la proteína fusionada a la luciferasa entera (Remy and Michnick, 2006), la cual puede considerarse la señal máxima para esa proteína. En nuestro caso, la actividad que somos capaces de detectar cuando co-transfectamos las dos mitades de la luciferasa está alrededor del 1 y 5% respecto a la actividad que detectamos con la proteína luciferasa entera. Así, para el par MLC1GLUC-N + MLC1GLUC-C, la señal que detectamos es 1,65% +/- 0,43 (N=14) de la actividad máxima, que sería la detectada para MLC1GLUC. En el caso del receptor de adenosina, la señal detectada para la complementación A2ARGLUC-N + A2ARGLUC-C es

un 3,5% +/- 0,83 respecto a la actividad detectada para A<sub>2</sub>ARGLUC (N=13).

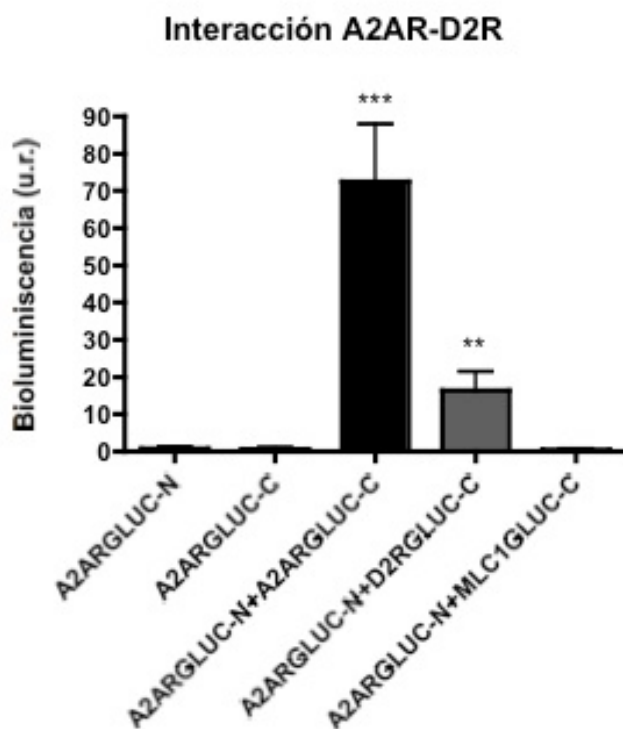
Asimismo, quisimos testar si este método era igual de bueno para otros receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Así, intentamos probar la dimerización del receptor de dopamina. Sin embargo, la señal obtenida de luminiscencia era bastante menor que la obtenida para MLC1 o A<sub>2</sub>AR. Por esta razón, aunque éramos capaces de detectar la homo-oligomerización de D<sub>2</sub>R, no terminábamos de creérnosla, ya que no existía diferencia significativa con la interacción considerada como inespecífica entre D<sub>2</sub>R y MLC1 (Figura 43).



**Figura 43: Dimerización del receptor D<sub>2</sub> de dopamina por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. No existe diferencia significativa entre la interacción D<sub>2</sub>R-D<sub>2</sub>R y D<sub>2</sub>R-MLC1. (N=3).

Tras haber validado hasta ahora solamente homo-interacciones (dimerización de zipper, MLC1, A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R), quisimos estudiar si este método era bueno para detectar hetero-interacciones. Así, estudiamos por BiLC la hetero-interacción ya descrita entre los receptores A<sub>2</sub> de adenosina y el receptor D<sub>2</sub> de dopamina, en las dos conformaciones posibles. Pudimos detectar interacción significativa entre ellos en una conformación, aquella

donde la parte N-terminal de la luciferasa estaba fusionada al receptor de adenosina y la parte C-terminal de la luciferasa, al receptor de dopamina (Figura 44). Esto puede explicarse porque ya obtuvimos poca señal cuando estudiamos la dimerización del receptor de dopamina, por lo que cuando estudiamos la hetero-interacción en la otra conformación (la parte N-terminal de la luciferasa fusionada a D<sub>2</sub>R y la parte C-terminal, a A<sub>2</sub>AR) la señal era mucho menor, no pudiendo detectar diferencia significativa entre la interacción D<sub>2</sub>R-A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R-MLC1 (ésta última considerada como interacción negativa) (datos no mostrados).



**Figura 44: Interacción entre A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se puede observar la dimerización de A<sub>2</sub>AR así como la hetero-interacción entre A<sub>2</sub>AR y D<sub>2</sub>R. \*\*\* p < 0,001 entre A<sub>2</sub>AR-A<sub>2</sub>AR y A<sub>2</sub>AR-MLC1. \*\* p < 0,01 entre A<sub>2</sub>AR-D<sub>2</sub>R y A<sub>2</sub>AR-MLC1. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. Interacción A<sub>2</sub>AR-A<sub>2</sub>AR, N=13. Interacción A<sub>2</sub>AR-MLC1, N=10. Interacción A<sub>2</sub>AR-D<sub>2</sub>R, N= 5

#### 4. PROTEÍNAS CANDIDATAS.

Tras los estudios proteómicos y genéticos que se llevaron a cabo en el grupo, disponíamos de una larga lista de posibles proteínas candidatas, bien a estar interaccionando con MLC1, bien a ser posible segundo gen implicado en

la enfermedad. En el grupo decidimos dividir la lista de proteínas en 2 grupos:

- 1) Proteínas típicas de uniones celulares, ya que MLC1 se localiza en uniones entre astrocitos (Duarri et al., 2011).
- 2) Proteínas con función de canal iónico o transportador, ya que el fenotipo vacuolizante de los pacientes de MLC sugería que la proteína MLC1 podría estar mediando la translocación de iones a través de la superficie celular.

Entre estas proteínas, yo me encargué de estudiar diferentes proteínas típicas de uniones celulares, como:

- CD9, una tetraspanina típica de uniones celulares, encontrada a través del screening genético usando la variante del Y2H *split-ubiquitin*.
- ZO-1 y Claudina-1, proteínas típicas de las uniones celulares estrechas (*tight junctions*), siendo identificadas a raíz de los estudios de proteómica.
- GlialCAM, una molécula de adhesión encontrada también gracias a la proteómica.

Asimismo, también centré parte de mis estudios en el canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2, que también se ha descrito en uniones celulares (Sik et al., 2000). Esta proteína no estaba en ninguna de nuestra lista de proteínas obtenidas a través de los métodos genéticos o proteómicos. Sin embargo, la considerábamos una proteína candidata a tener alguna relación con MLC1 porque los ratones KO para dicho canal presentaban un fenotipo vacuolizante muy similar al que presentaban los pacientes de MLC.

En todos los casos, se procedió a insertarles 3 epítomos HA o Flag, tanto en la región N-terminal como en la C-terminal cuando era posible. Con esto se pretendía encontrar aquella variante donde la inserción del epítopo no afectaba

al correcto procesamiento de la proteína. El hecho además de insertarles dicho epítopo era para ahorrar en anticuerpos y no comprar un anticuerpo para cada una de las proteínas candidatas que teníamos. Además, debido a estudios previos, sabíamos que los anticuerpos comerciales no siempre funcionaban. En cambio, los anticuerpos contra los epítomos HA o Flag sí lo hacían.

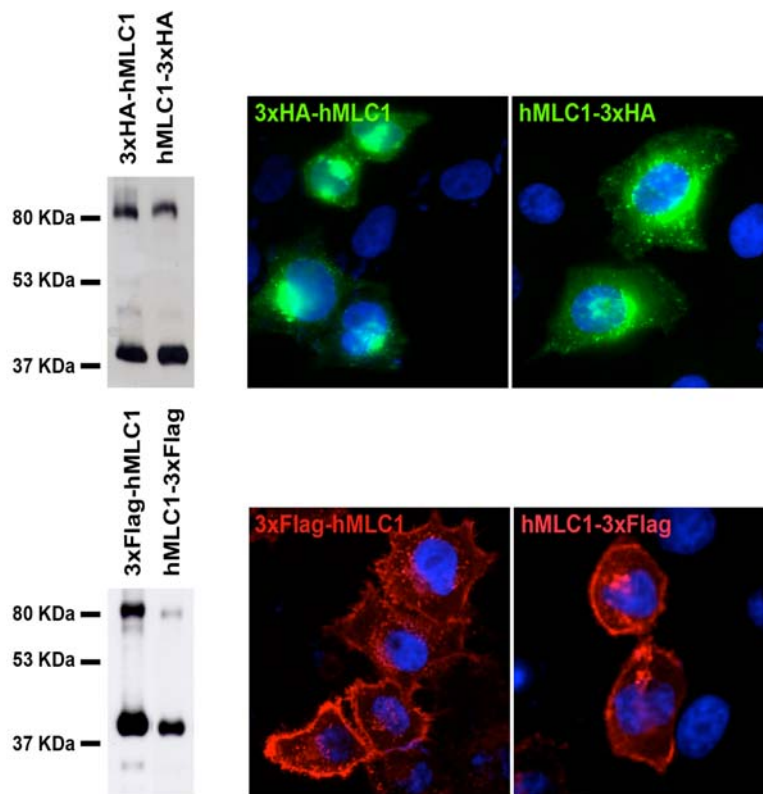
La hoja de ruta que se decidió tomar para ver si estos candidatos eran verdaderos interactores de MLC1 o no, fue la de comprobar si éstos co-localizaban en astrocitos primarios con MLC1, ya que en éstos MLC1 se encuentra presente endógenamente. Si no co-localizaban ya no procederíamos al siguiente paso de validación. Si fuera que sí co-localizan, se llevaría a cabo la validación de dicha interacción *in vitro*, tanto con estudios de co-inmunoprecipitación como con los métodos de interacción basados en la complementación de fragmentos de proteína, así como se intentarían estudios funcionales de dicha interacción.

No obstante, antes de llevar a cabo la transfección de las diferentes construcciones en astrocitos, primero se estudiaron por WB y por inmunofluorescencia tras ser transfectadas en células HeLa para comprobar que la inserción de los epítomos no afectaba ni a la expresión ni a la localización de las proteínas.

La primera proteína a la que le insertamos los epítomos HA y Flag fue a nuestra proteína MLC1. Se fusionaron tanto en la parte N-terminal como en la parte C-terminal de la proteína. Todas las combinaciones se transfectaron y se estudiaron los niveles de expresión así como la localización de la proteína por inmunofluorescencia. Como puede observarse en la figura 45, la proteína MLC1 se expresa prácticamente igual por WB con ambos epítomos y en



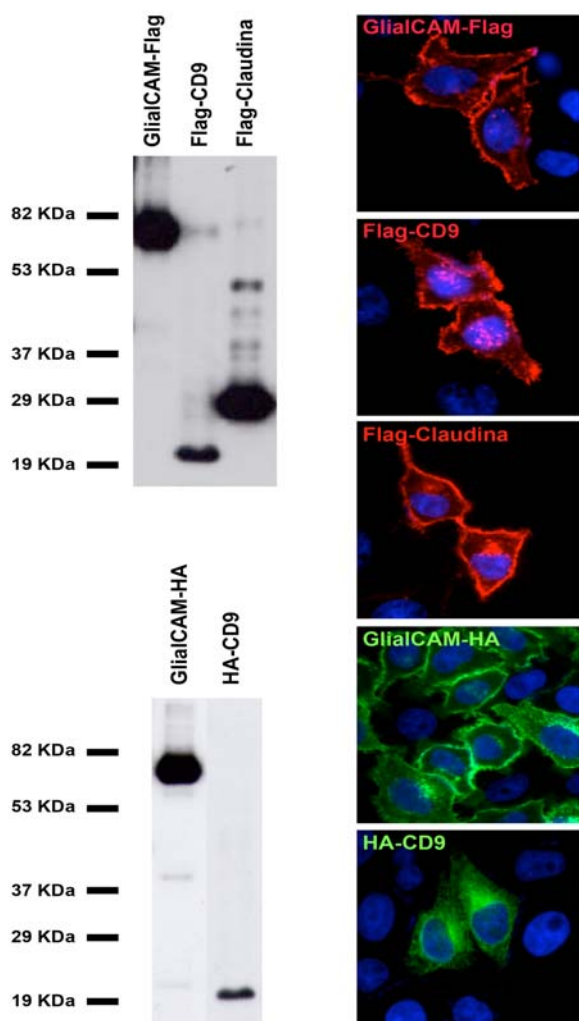
cualquiera de las combinaciones posibles. Sin embargo, la localización de la misma difiere. Cuando presenta fusionado los epítomos HA parece que la proteína se queda más retenida intracelularmente, mientras que con los epítomos Flag, la proteína es capaz de alcanzar la membrana plasmática.



**Figura 45: Expresión y localización de MLC1 con los epítomos HA y Flag fusionados tanto en N- como en C-terminal.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron analizadas por WB e inmunofluorescencia usando anticuerpos contra el epítomo HA o Flag. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.

A la proteína GlialCAM, se le fusionaron 3 epítomos HA y 3 epítomos Flag únicamente en la región C-terminal, ya que la zona N-terminal de la proteína está en la parte extracelular. Además, en dicha región presenta un péptido señal. A la proteína Claudina-1, sólo se le pudieron fusionar los epítomos Flag en la región N-terminal. A la proteína CD9, se le insertaron tanto los epítomos HA como Flag en la región N-terminal exclusivamente. Se realizó así porque en la metodología *Y2H split-ubiquitin* el *tag* de la ubiquitina estaba en dicha posición. En la figura 46 puede observarse que todas las combinaciones resultaron en un buen nivel de expresión por WB. Asimismo, todas mostraban una localización en la membrana plasmática, salvo para el caso de CD9

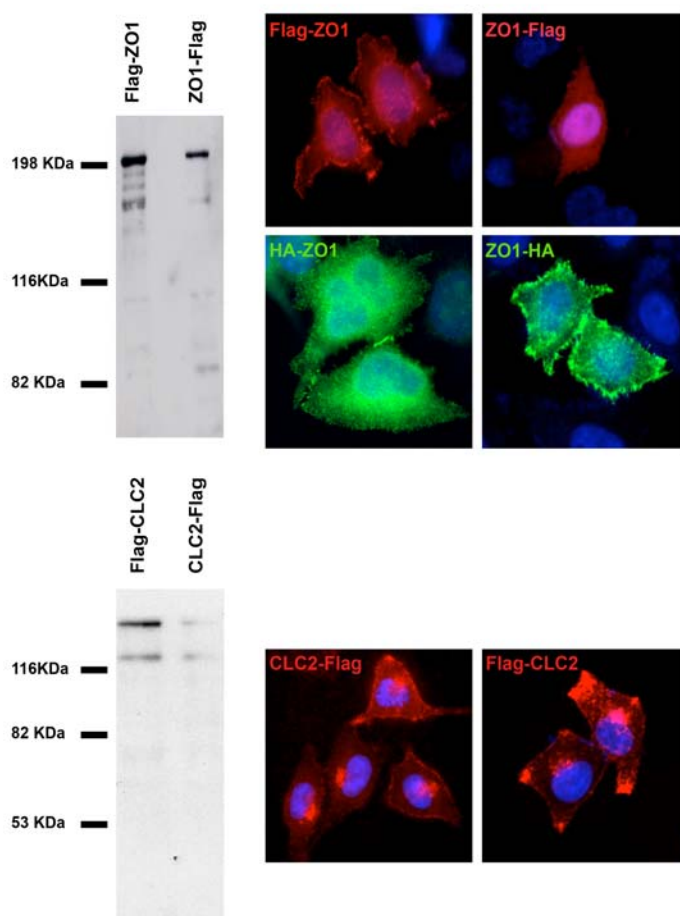
cuando tenía fusionado el epítipo HA, que presentaba una localización más retenida intracelularmente (Figura 46).



**Figura 46: Expresión y localización de GlialCAM, CD9 y Claudina-1 con los epítipos HA y Flag fusionados.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y fueron analizadas por WB e inmunofluorescencia usando anticuerpos contra el epítipo HA o contra el epítipo Flag. Se observa un buen nivel de expresión de todas las construcciones y todas, salvo HA-CD9 son capaces de llegar a la membrana plasmática. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.

Por otro lado, a la proteína ZO1 se le fusionaron 3 epítipos HA y 3 epítipos Flag, tanto en la región N-terminal como en la C-terminal. En cambio, al canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2 solo se le fusionaron los epítipos Flag, pero también en ambas regiones, en el N- y en el C-terminal. Con estas proteínas se tuvieron más problemas a la hora de la detección por WB, ya que son mucho más pesadas y no siempre se conseguía una buena transferencia de las proteínas. Es por ello, que por ejemplo, para el caso de ZO1, solo se consiguió detectarla por WB en los casos donde la proteína presentaba fusionados los epítipos

Flag, y no con los epítomos HA (Figura 47). Sin embargo, por inmunofluorescencia sí se consiguieron observar todas las construcciones clonadas. La proteína podía detectarse en el citosol y también cerca de la membrana plasmática (Figura 47). En el caso de CLC-2, pudo observarse por inmunofluorescencia que era capaz de llegar a la membrana plasmática, aunque había gran parte que quedaba retenida intracelularmente, posiblemente en el retículo endoplasmático (Figura 47).

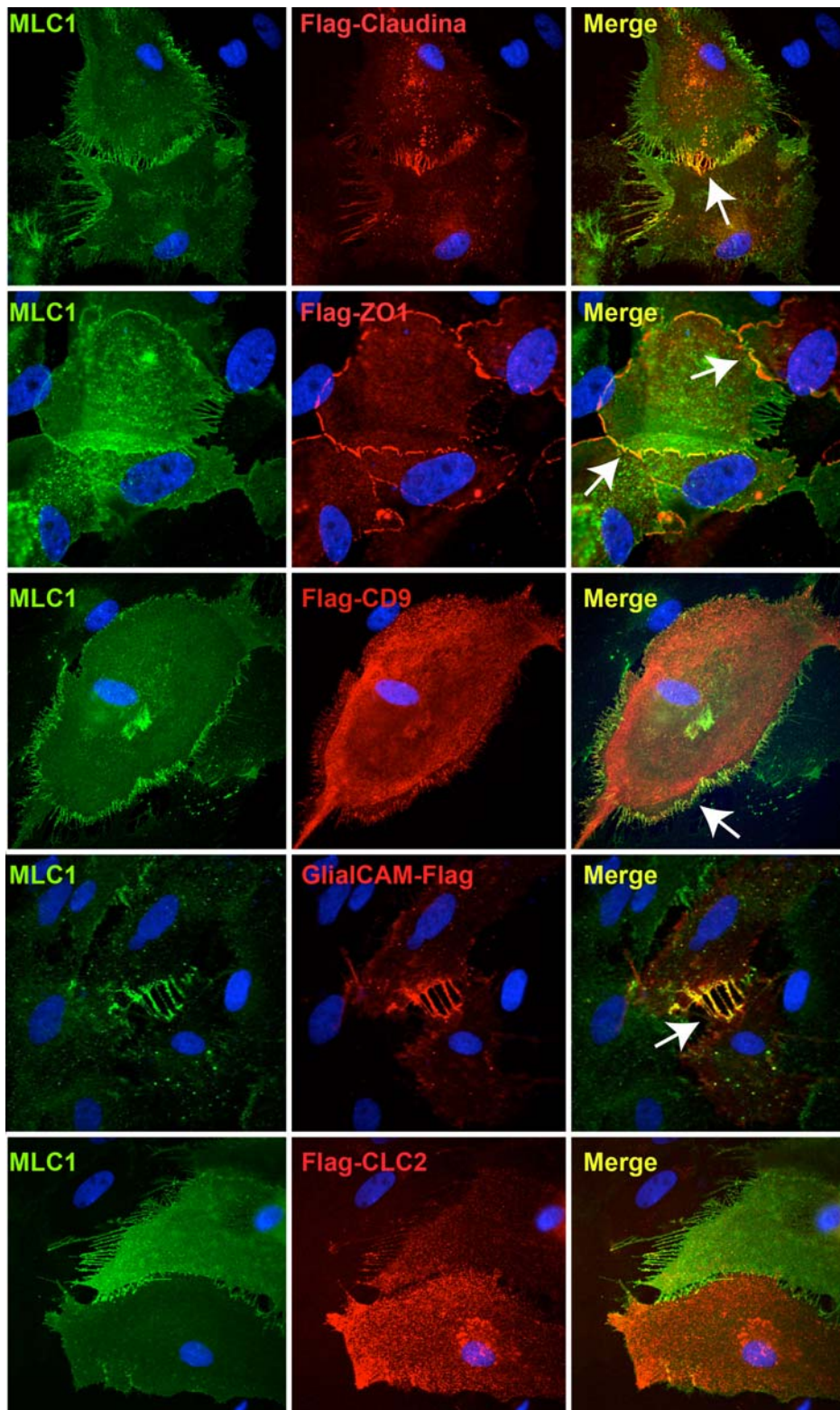


**Figura 47: Expresión y localización de ZO-1 y CLC-2 con los epítomos HA y Flag fusionados.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y fueron analizadas por WB e inmunofluorescencia usando anticuerpos contra el epítomo HA o contra el epítomo Flag. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.

Tras el estudio en células HeLa procedimos a estudiar las proteínas candidatas en cultivos primarios de astrocitos. Los astrocitos eran cultivados durante 3 semanas y parados en ciclo con un compuesto llamado AraC, para favorecer así su diferenciación. Este modelo celular fue puesto a punto en el

grupo previamente (Duarri et al., 2011). En él, se observaba a MLC1 en las uniones astrocitarias.

De todas las construcciones posibles que se habían clonado para cada proteína candidata se eligieron las construcciones que presentaban los epítomos Flag fusionados (que funcionaban bien en células HeLa) para ser transfectadas en astrocitos. Después de transfectar dichas construcciones y estudiar por inmunofluorescencia si tales proteínas candidatas co-localizaban o no con MLC1, pudimos observar que todas ellas, salvo el canal de  $\text{Cl}^-$  CIC-2 eran capaces de llegar a la membrana plasmática y co-localizar con MLC1 en mayor o menor medida en los procesos astrocitarios o en los contactos astrocito-astrocito (Figura 48).

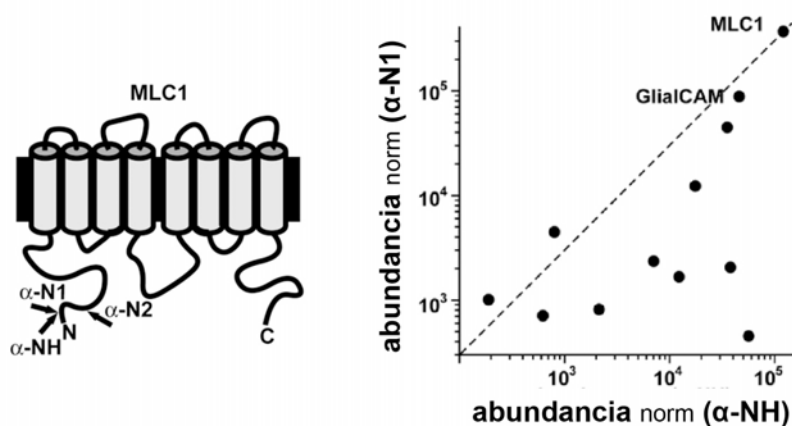


**Figura 48: Localización de Claudina, ZO1, CD9, GlialCAM y CIC-2 en astrocitos primarios de rata.** Astrocitos primarios de rata fueron diferenciados con AraC durante 3 semanas y entonces fueron transfectadas con las construcciones correspondientes, todas ellas con los 3 epítomos Flag fusionados. Tras 48 horas los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando anticuerpos contra MLC1 (en verde) y contra el epítomo Flag (en rojo). La co-localización de ambas proteínas puede verse en la superposición de las imágenes en amarillo (merge). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas indican las zonas de uniones entre astrocitos donde se observa una mayor co-localización. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.



Una vez realizado este estudio en astrocitos, y ver que ZO1, Claudina1, CD9 y GlialCAM co-localizaban con MLC1, nos disponíamos a estudiar estas proteínas mediante los métodos de interacción basados en la complementación de fragmentos de proteína, así como estudios de co-inmunoprecipitación.

Paralelamente al inicio de comenzar los estudios de interacción con las proteínas candidatas que habían co-localizado con MLC1 en astrocitos, se estaba desarrollando una colaboración con el grupo de investigación holandés dirigido por la Dra. Marjo van der Knaap (que fue quien describió la enfermedad por primera vez), en la cual le habíamos informado de algunos genes (de nuestra lista de candidatos posibles) que podían testar en los pacientes que no presentaban mutaciones en *MLC1*. Fue en este momento cuando encontraron que GlialCAM, además de estar altamente asociado con MLC1 en estudios de proteómica (Figura 49), era el segundo gen implicado en la enfermedad, puesto que se encontraron mutaciones en ese 25% de pacientes que no tenían mutaciones en *MLC1* ni ligaban con su locus.



**Figura 49: Evaluación de las diferentes purificaciones por afinidad con los anticuerpos indicados contra MLC1 (realizado por la empresa *Logopharm*).** Gráfico 2D de las diferentes abundancias de proteínas determinadas por espectrometría de masas usando dos anticuerpos diferentes contra MLC1 (el N1 y el NH) y habiendo hecho co-inmunoprecipitaciones usando membranas de cerebro de rata y ratón. (ver (Lopez-Hernandez et al., 2011a)).

En este 25% de pacientes, la enfermedad se manifestaba de dos maneras diferentes: en un caso, los enfermos presentaban las mismas características clínicas y la misma afectación en la sustancia blanca del cerebro que los pacientes con mutaciones en *MLC1*; y en el otro caso, presentaban síntomas transitorios y los pacientes mejoraban, llegando incluso a que la enfermedad remitiera (van der Knaap et al., 2010).

Tras el análisis de 40 de estos pacientes encontraron que cuando los enfermos tenían las características clínicas típicas de MLC, presentaban dos mutaciones en *GLIALCAM* (herencia recesiva); mientras que en el caso de aquellos que mejoraban a lo largo del tiempo, éstos solo presentaban una mutación (herencia dominante), demostrando que *GLIALCAM* era el segundo gen de MLC para los dos tipos de fenotipos. En este estudio también se pudo determinar que mutaciones dominantes en *GLIALCAM* podían causar otras enfermedades como la macrocefalia familiar benigna y la macrocefalia con retraso mental, con o sin autismo (Lopez-Hernandez et al., 2011a).

Este importante descubrimiento permitió, que de tener varias proteínas candidatas a estudiar, se focalizaran las energías en estudiar a fondo a GlialCAM.

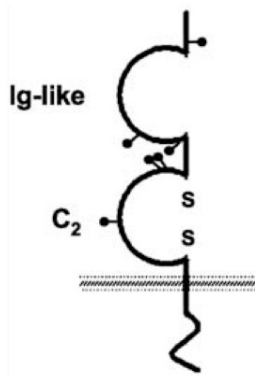
## **5. GLIALCAM.**

### **5.1. Introducción**

El gen *GLIALCAM* (también llamado *HEPACAM*) está localizado en el cromosoma humano 11q24 y presenta 7 exones. Codifica para un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Con 416 aminoácidos predichos, da lugar a la estructura típica de una molécula de adhesión, incluyendo dos

dominios extracelulares *Ig-like* (uno *Ig-like* y otro C2, predichos por los programas informáticos *Signal P* y *SMART*), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

## GlialCAM



**Figura 50: Ilustración esquemática de la estructura secundaria de la proteína GlialCAM.** GlialCAM presenta la estructura típica de un subtipo de moléculas de adhesión pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Presenta un segmento extracelular con un dominio *Ig-like* próximo al N-terminal y un dominio *Ig* tipo *C2* próximo a la membrana plasmática con un puente disulfuro formado entre dos residuos de cisteína. Asimismo presenta una región transmembrana y una cola citoplasmática. La proteína presenta 6 lugares putativos de N-glicosilación (representados con círculos negros en la parte extracelular). Adaptado de (Moh et al., 2005).

GlialCAM fue originalmente identificado como un putativo gen supresor de tumor en el hígado humano, ya que exhibe efectos antiproliferativos *in-vitro* (reduce la formación de colonias e inhibe el crecimiento celular en líneas de carcinomas hepatocelulares (HCC)). Además, se encuentra fuertemente silenciado en el 87% de pacientes con HCC y en el 100% de las líneas HCC cuando los hepatocitos se convierten cancerosos, lo que indica que la pérdida de la expresión de GlialCAM puede estar asociada con la hepatocarcinogénesis (Chung Moh et al., 2005).

Los trabajos de Moh en 2005 y de Gaudry en 2008 mostraron que GlialCAM es una glicoproteína transmembrana de tipo I con estructura similar a las IgCAMs, como las JAMs (*junctional adhesión molecules*) y las ESAM (*endothelial cell-selective adhesión molecules*) (Moh et al., 2005), (Gaudry et al., 2008). Asimismo, identificaron que GlialCAM está fosforilada en el dominio citoplasmático (presenta una zona rica en prolinas que putativamente puede proveer sitios de unión a dominios SH3 y tener potenciales sitios de fosforilación para serina/treonina y tirosina kinasas) (Moh et al., 2005). Esto



podría ser importante para las cascadas de señalización que controlan la adhesión celular, la migración, la morfología celular, procesos que tienen que ver con el citoesqueleto, etc.

En el trabajo de Moh de 2005, también se sugiere que GlialCAM forma dímeros. Lo demuestran de varias maneras. Por un lado incuban monocapas de células con agentes *cross-linkers* (BS3 y DTSSP). Observan una banda de 150 kDa aproximadamente, la cual parece representar la forma dimerizada de GlialCAM a la vez que ven una disminución en la señal que corresponde a la banda que de 75 kDa (que correspondería a la forma monomérica). También co-expresan 2 formas de GlialCAM, una fusionada a GFP y otra a V5 y realizan co-inmunoprecipitaciones. Son capaces de co-inmunoprecipitar GlialCAM-V5 cuando co-inmunoprecipitan usando un anticuerpo contra GFP, demostrando que GlialCAM dimeriza formando interacciones homofílicas. Para determinar si GlialCAM forma dímeros en *cis* o en *trans* sobre la superficie celular, trataron monocapas adherentes o bien una suspensión celular transfectadas con GlialCAM con el agente *cross-linker* BS3. Observaron prácticamente la misma dimerización en células adherentes que en suspensión de células, lo que sugería que la homodimerización ocurre predominantemente a través de interacciones en *cis* (más que en *trans*) dentro del mismo plano de la membrana de células individuales (Moh et al., 2005). Asimismo, también sugieren que dichos *cis*-homodímeros podrían ser necesarios para las propiedades de adhesión celular, como ocurre con E-cadherina.

Otro aspecto a resaltar de dicho trabajo es que la localización de GlialCAM depende de la confluencia celular. Así, se localiza predominantemente en la membrana plasmática particularmente en áreas de

contactos célula-célula cuando existe confluencia celular. Si no es así, GlialCAM presenta una localización más difusa quedando bastante cantidad de proteína en el citosol (Moh et al., 2005).

A través de experimentos de *cell spreading*, *cell detachment* y *wound healing*, (Moh et al., 2005) se demuestra que GlialCAM es una molécula de adhesión involucrada en interacciones con la matriz, pues su transfección incrementa la motilidad celular, acelera el enganche celular a un sustrato o bien se desengancha más lentamente, todavía hoy por un mecanismo desconocido. El dominio citoplasmático es necesario para dicha modulación célula-matriz, pues los mismos experimentos con variantes de GlialCAM que carecían de dicho dominio citoplasmático mostraban un enganche más lento a un sustrato o bien se desenganchaban más rápido que la proteína salvaje. En cambio, dichas variantes que no contenían el dominio citoplasmático no afectaban ni a la localización subcelular de la proteína, pues eran capaces de alcanzar la membrana plasmática, ni afectaban a la formación de homodímeros (Moh et al., 2005).

En 2006, Spiegel y colaboradores identificaron GlialCAM en librerías de cDNAs obtenidas a partir de células de Schwann primarias de rata estimuladas con dibutilil AMPc, y en el nervio ciático (Spiegel et al., 2006), sugiriendo un posible papel de GlialCAM en el sistema nervioso periférico (SNP) y particularmente en estadios tempranos de interacciones axón-glía y/o en mielinización.

En 2008, en el trabajo de (Favre-Kontula et al., 2008) clonan por primera vez el cDNA de GlialCAM de una librería de cerebro humano. Dicen que GlialCAM se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso en humanos y

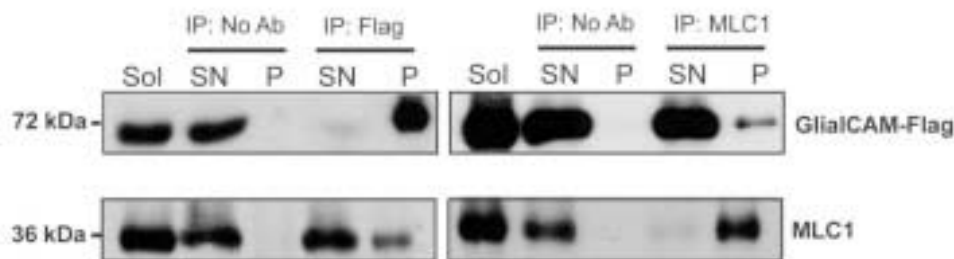
en ratón; y que la expresión en hígado es muy baja en humanos y casi indetectable en el ratón. Así, se detectó expresión de GlialCAM en células ependimales de zonas ventriculares del cerebro y en el canal central de la médula espinal. También se detectó en oligodendrocitos, indicando un potencial papel en la mielinización, ya que su expresión aumentaba durante el desarrollo postnatal del SNC, siguiendo el mismo perfil de expresión que el de MBP. Además, *in-vitro*, se ha detectado su expresión en 3 estadios distintos de diferenciación de oligodendrocitos. No se ha detectado en microglía, pero sí en astrocitos, en contactos célula-célula. Por tanto, la expresión de GlialCAM en oligodendrocitos, astrocitos y células ependimales sugiere un papel multifuncional para esta proteína en el mantenimiento de la vaina de mielina, así como en la función astrocitaria y de las barreras del SNC.

## **5.2 Estudios bioquímicos para demostrar la interacción entre MLC1 y GlialCAM.**

Una vez que supimos que *GLIALCAM* era el segundo gen implicado en la enfermedad quisimos avanzar en la relación bioquímica que existía entre MLC1 y GlialCAM. Gracias a los estudios proteómicos realizados por la empresa Logopharm pudimos saber que cuando co-inmunoprecipitaban membranas de cerebro de rata y ratón utilizando tres anticuerpos diferentes contra MLC1, GlialCAM era capaz de co-inmunoprecipitar (Lopez-Hernandez et al., 2011a). Pero no todo GlialCAM co-inmunoprecipitaba con MLC1, posiblemente porque no todo GlialCAM estaba asociado con MLC1 o porque la asociación se pudiera romper cuando se llevaba a cabo la solubilización de las proteínas de membrana. Esta interacción fue reconfirmada en experimentos de purificación por afinidad reversos, usando un anticuerpo contra GlialCAM que

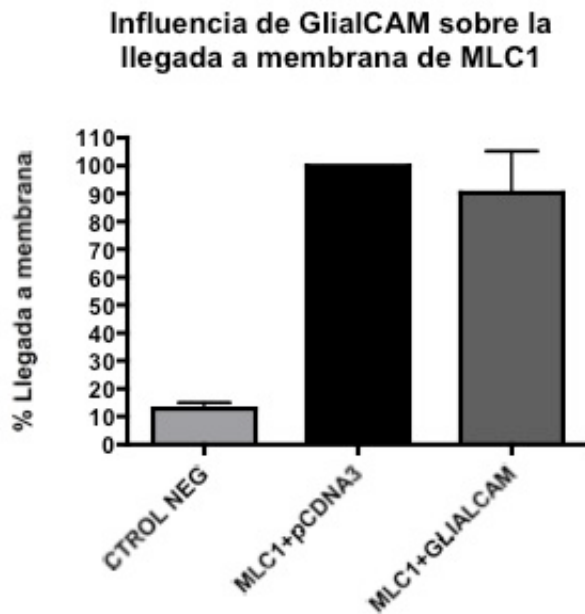
era capaz de co-inmunoprecipitar específicamente MLC1. En este caso, casi todo MLC1 estaba asociado a GlialCAM (Lopez-Hernandez et al., 2011a).

Fue por tanto, que lo primero que quisimos estudiar era si esta interacción era directa o indirecta. Para ello se hicieron estudios de co-inmunoprecipitación *in-vitro* en células HeLa. Así, fuimos capaces de co-inmunoprecipitar GlialCAM cuando usábamos un anticuerpo contra MLC1 y al revés, también pudimos detectar MLC1 cuando usamos para inmunoprecipitar un anticuerpo contra GlialCAM (Figura 51), demostrando así una interacción directa entre ambas proteínas.



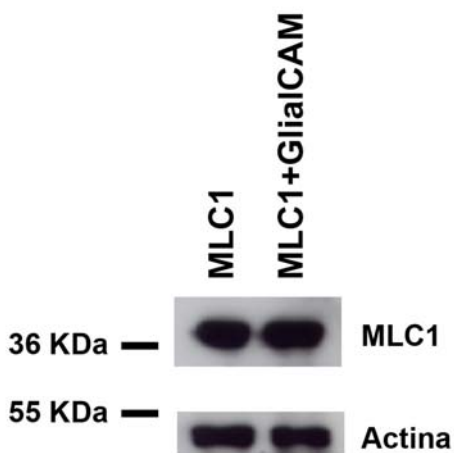
**Figura 51: Interacción directa entre MLC1 y GlialCAM.** Células HeLa transfectadas con MLC1 y GlialCAM con 3 epítopos Flag fueron solubilizadas (Sol) y luego inmunoprecipitadas usando bolas con anti-MLC1 o anti-Flag. La inmunoprecipitación en ambos casos fue eficiente y específica, pues se inmunoprecipitó prácticamente el 100% de MLC1 cuando se inmunoprecipitaba usando un anticuerpo contra MLC1, y de GlialCAM cuando se llevó a cabo la inmunoprecipitación usando un anticuerpo contra Flag. MLC1 estaba presente en el co-inmunoprecipitado de GlialCAM y GlialCAM en el inmunoprecipitado de MLC1, confirmando la interacción directa.

El siguiente paso fue estudiar si GlialCAM afectaba a los niveles en superficie de MLC1. Tras estudios de inmunodetección basados en bioluminiscencia usando una construcción de MLC1 con un epítipo HA extracelular pudimos observar que GlialCAM no modificaba los niveles en la membrana plasmática de MLC1 (Figura 52).



**Figura 52: GlialCAM no modifica los niveles en superficie de MLC1 en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes. Tras 48 horas, la expresión en superficie de MLC1 con un epítipo HA extracelular fue cuantificada a través de experimentos de bioluminiscencia usando un anticuerpo contra el epítipo HA extracelular. No se observaron diferencias significativas (N=6).

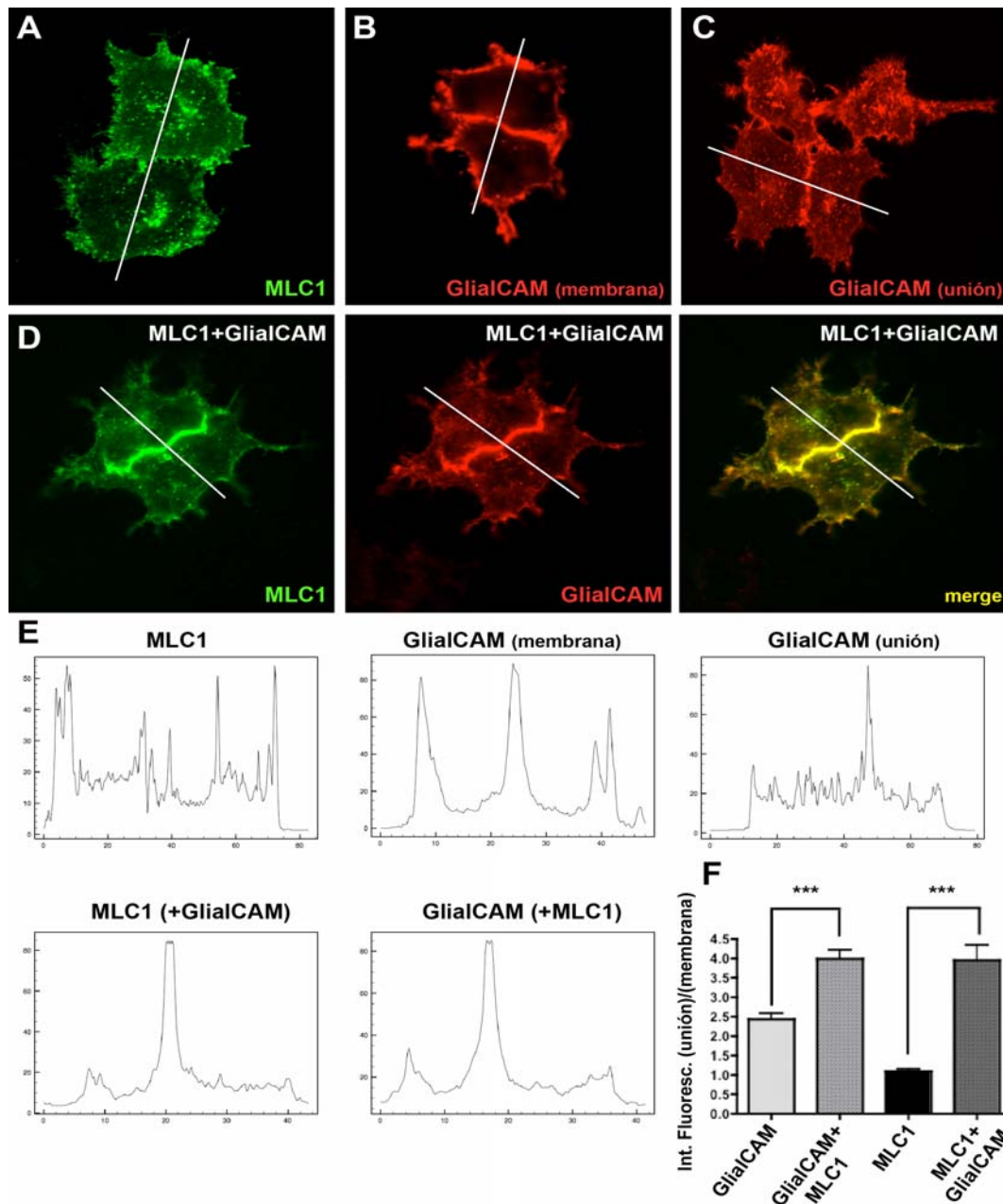
Asimismo, GlialCAM tampoco aumentaba los niveles de expresión de MLC1 (Figura 53).



**Figura 53: La sobreexpresión de GlialCAM no afecta a los niveles de expresión de MLC1 en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB. La expresión de MLC1 no varía en presencia de GlialCAM. Control de carga realizado con anti  $\beta$  actina.

Lo siguiente que quisimos estudiar fue esta interacción por inmunofluorescencia, también en células HeLa (Figura 54). Cuando MLC1 era transfectada sola, se localizaba alrededor de la membrana plasmática (Figura 54 A), aunque también bastante cantidad de proteína quedaba retenida

intracelularmente. Por otro lado, cuando transfectábamos GlialCAM sola, la proteína se encontraba principalmente en el contacto entre dos células (Figura 54 C), aunque en algunas ocasiones también detectábamos a GlialCAM alrededor de toda la membrana (Figura 54 B). Lo sorprendente fue cuando co-transfectamos ambas proteínas a la vez, ya que MLC1 cambiaba su localización y ahora era capaz de concentrarse en las uniones celulares, co-localizando con GlialCAM (Figura 54 D). Para cuantificar este enriquecimiento calculamos la ganancia de la intensidad de fluorescencia en las uniones ( $R = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia en la unión}}{\text{media de intensidad de fluorescencia en la membrana de la célula 1 y de intensidad de fluorescencia en la membrana de la célula 2}}$ ) trazando una línea a lo largo de las dos células estudiadas y usando el programa informático *Image J*. Pudimos observar que tanto MLC1 como GlialCAM estaban más enriquecidas en las uniones cuando eran co-transfectadas con la otra. Esta ganancia era mayor en el caso de MLC1, pero en ambos casos, la ganancia era significativa (Figura 54 F).



**Figura 54: Interacción directa entre MLC1 y GlialCAM por inmunofluorescencia.** Células HeLa fueron transfectadas con MLC1 salvaje, GlialCAM salvaje con 3 epítopos Flag o con ambos plásmidos conjuntamente. **(A)**, MLC1 salvaje transfectado solo. Se puede ver que MLC1 se localiza alrededor de la membrana y también parte queda intracelular. **(B y C)** GlialCAM salvaje transfectado solo. En **B** se observa GlialCAM en la membrana plasmática y en **C**, concentrado en las uniones entre células **(D)** Co-transfección de MLC1 más GlialCAM. Puede observarse el cambio de localización de MLC1, concentrado ahora en el contacto entre las dos células. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra GlialCAM). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con spinning disk DSU Olympus. **(E)** Se muestra el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente a cada imagen de A-D a través de la línea indicada. **(F)** Pares de células fueron analizadas llevando a cabo un perfil de intensidad de fluorescencia. El análisis reveló que MLC1 transfectado solo tiene un valor de R ( $R = \text{Intensidad Union} / (\text{Intensidad membrana célula 1} + \text{Intensidad membrana célula 2})$ ) de  $1.08 \pm 0.06$  ( $n = 45$ ), y MLC1 en presencia de GlialCAM tiene un valor de  $3.95 \pm 0.06$  ( $n = 42$ ). Por otro lado, GlialCAM transfectado solo tiene un valor de R de  $2.43 \pm 0.15$  ( $n = 44$ ) mientras que GlialCAM en la presencia de MLC1 tiene un valor de  $3.99 \pm 0.23$  ( $n = 42$ ).

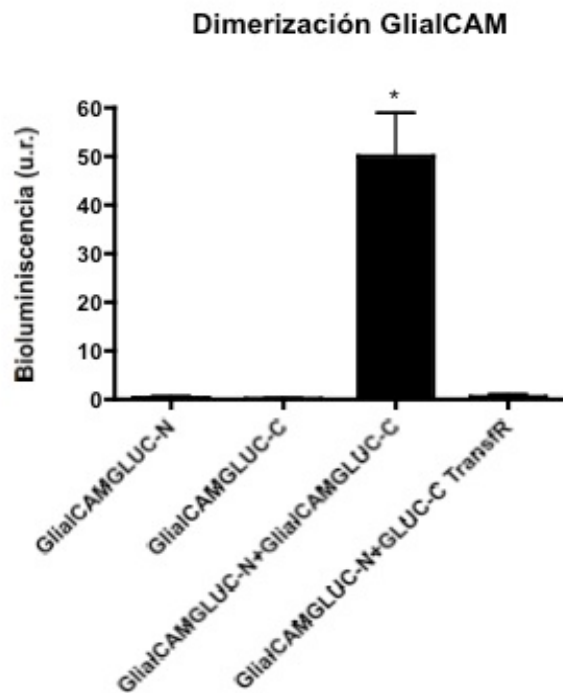
Posteriormente, se procedió a utilizar los métodos que había puesto a punto en el laboratorio para validar la interacción entre MLC1 y GlialCAM. Sin embargo, ni el *BiFC* ni el *BiLC* nos lo permitieron.

Para probar el método de *BiFC*, se procedió en primer lugar al clonaje de la proteínas necesarias. Esto era, fusionar ambas mitades de la proteína fluorescente Venus a GlialCAM, así como fusionarle también la proteína entera. El primer paso fue transfectar la proteína GlialCAM con la proteína Venus completa, para ver si la proteína se expresaba bien y no veía afectada su biología. Fue aquí cuando comprobamos que la fusión de Venus hacía que GlialCAM se quedara mayoritariamente retenida alrededor del núcleo en agregados, aunque en algunas ocasiones podía detectarse algo en la membrana o en contactos entre células. A pesar de ello, intentamos detectar la homo-dimerización ya descrita de GlialCAM (Moh et al., 2005) por este método. Aunque fuimos capaces de detectar fluorescencia, la señal estaba nuevamente agregada alrededor del núcleo. Lo mismo pasó cuando estudiamos la hetero-interacción entre GlialCAM y MLC1. Por tanto, podemos decir que esta metodología no nos sirvió para demostrar la interacción entre MLC1 y GlialCAM, ya que la fusión de Venus a GlialCAM no permitía el correcto procesamiento celular de la proteína y no podía alcanzar la membrana plasmática, que es ahí donde nos interesaba observar la interacción.

La otra metodología que había puesto a punto era la complementación bimolecular de luminiscencia o *BiLC*. Lo primero que se quiso probar fue si éramos capaces de detectar la dimerización de GlialCAM (Moh et al., 2005). Por este método sí se pudo detectar de manera específica, ya que como control negativo de interacción se utilizó otra proteína de un único paso

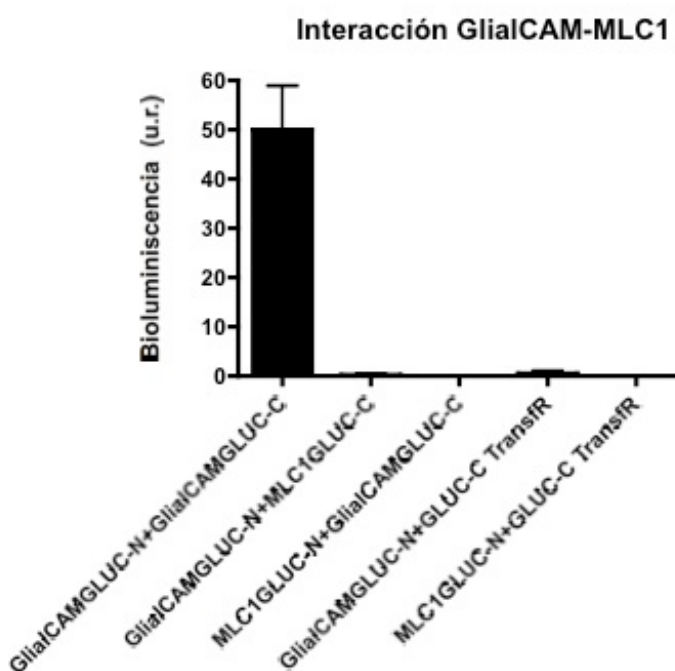


transmembrana (de topología similar a GlialCAM) como el receptor de Transferrina, y con dicha proteína no se detectó interacción (Figura 55).



**Figura 55: Dimerización de GlialCAM por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se puede observar la dimerización de GlialCAM y la no interacción con el receptor de Transferrina. \*  $p < 0,05$  entre GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-TransfR. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. Interacción GlialCAM-GlialCAM N=7. Interacción GlialCAM-TransfR N=3.

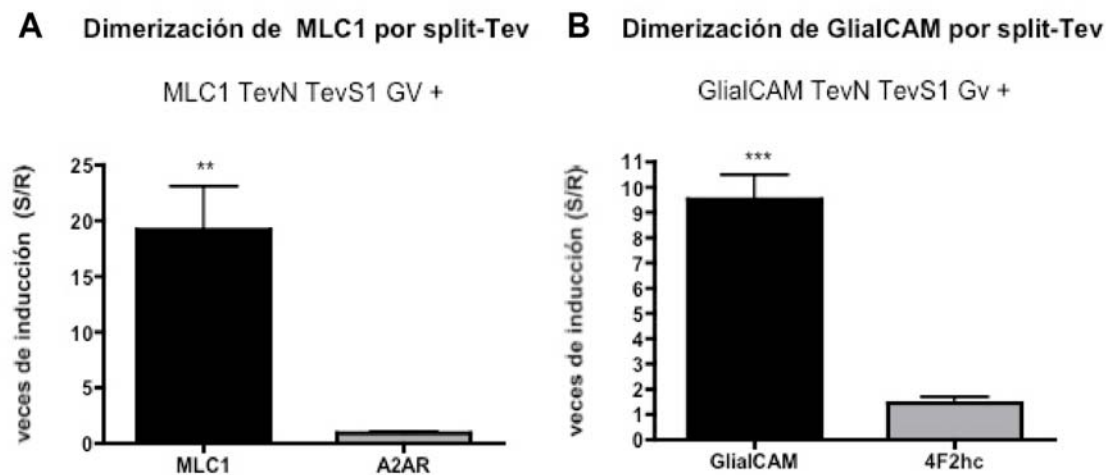
El siguiente paso fue estudiar la interacción entre MLC1 y GlialCAM por BiLC. Sin embargo, no pudimos detectar interacción (Figura 56).



**Figura 56: Interacción entre MLC1 y GlialCAM por BiLC.** Células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidas *in-vivo* en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se puede observar la dimerización de GlialCAM pero no la interacción con MLC1 (N=3). Tampoco se detecta señal entre GlialCAM y el receptor de Transferrina (N=3), ni entre MLC1 (con la mitad de la luciferasa fusionado en el C terminal) con el receptor de Transferrina (N=2)

Con todo esto, se intentó validar la interacción entre MLC1 y GlialCAM por otro método de complementación de fragmentos de proteínas que había sido puesto a punto en el laboratorio por mi compañero Xavier Capdevila, el cual presenta una mayor sensibilidad para detectar interacciones. Este método se denomina *split-TEV*, y la proteína reportera es la TEV proteasa. Consiste en fusionar una mitad de la TEV a MLC1 y la otra mitad a GlialCAM. Si interaccionan, la TEV proteasa se reconstituirá y cortará, liberando un factor de transcripción que activará un gen reportero, que en este caso es una luciferasa.

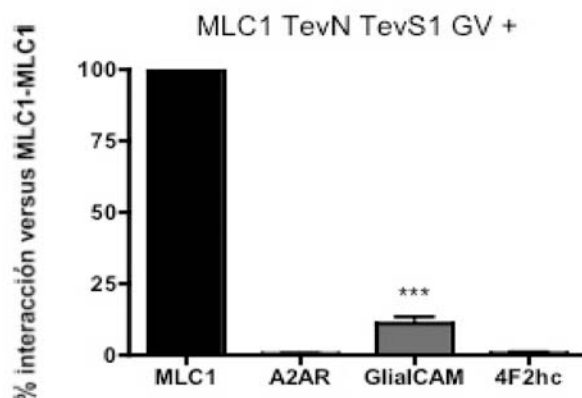
Antes de utilizar esta metodología para estudiar la hetero-interacción entre MLC1 y GlialCAM, quisimos probarla para ver si éramos capaces de detectar la homo-oligomerización de MLC1 y la de GlialCAM, siendo la respuesta positiva (Figura 57).



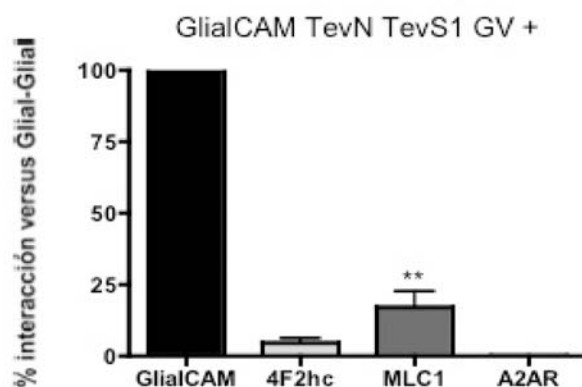
**Figura 57: Dimerización de MLC1 y GlialCAM por *split-TEV*.** Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa las veces de inducción de la señal obtenida entre la señal considerada como ruido (en este caso, es la señal que se obtiene para MLC1 TevN TevS1 GV y para GlialCAM TevN TevS1 GV). (A) Dimerización de MLC1. Se puede observar diferencia significativa en el nivel de inducción entre la señal obtenida para la interacción entre MLC1-MLC1 (N=10) y la de MLC1 y A2AR (N=6), que se considera interacción negativa. \*\*  $p < 0,01$ . (B) Dimerización de GlialCAM. Se observa diferencia significativa entre la señal obtenida para la interacción GlialCAM-GlialCAM (N=14) y la de GlialCAM-4F2hc (N=14), considerada interacción negativa. \*\*\*  $p < 0,001$ . Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Una vez detectadas las homo-oligomerizaciones de MLC1 y GlialCAM, decidimos estudiar la hetero-interacción entre ambas proteínas por este método. Fuimos capaces de detectar la interacción, probando además las dos conformaciones posibles (Figura 58).

### A Hetero-interacción entre MLC1 y GlialCAM por split-TEV



### B Hetero-interacción entre GlialCAM y MLC1 por split-TEV

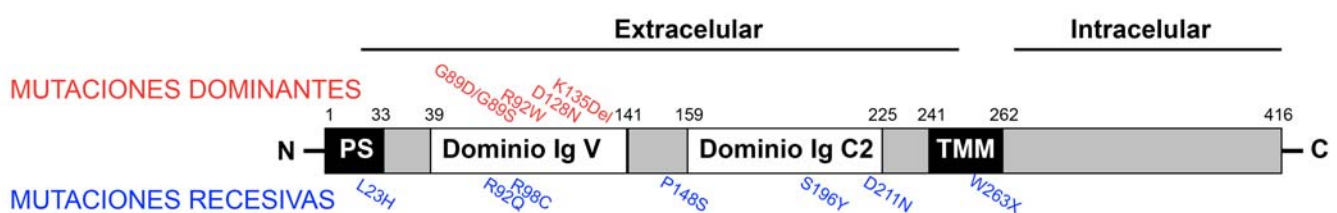


**Figura 58: Interacción positiva entre MLC1 y GlialCAM por split-TEV.** Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción homofílica de MLC1 (A) o de GlialCAM (B). (A) Interacción entre MLC1 y GlialCAM cuando la parte N terminal de la Tev más el sitio de reconocimiento de la Tev proteasa más el factor de transcripción GV están fusionados al extremo C terminal de MLC1. Se observa interacción significativa entre MLC1 y GlialCAM. \*\*\* $p < 0,001$  entre la interacción MLC1-GlialCAM (N=10) y MLC1-4F2hc (N=8) o MLC1-A2AR (N=6), que son consideradas interacciones negativas. (B) Interacción entre GlialCAM y MLC1 cuando la parte N terminal de la Tev más el sitio de reconocimiento de la Tev proteasa más el factor de transcripción GV están fusionados al extremo C terminal de GlialCAM. Puede detectarse también interacción positiva significativa entre GlialCAM y MLC1. \*\* $p < 0,01$  entre la interacción GlialCAM-MLC1 (N=5) y GlialCAM-A2AR (N=3) o GlialCAM-4F2hc (N=9), que son consideradas interacciones negativas. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Otra metodología que se implementó para demostrar la interacción entre MLC1 y GlialCAM fue la basada en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Ésta fue llevada a cabo en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Francisco Ciruela, profesor del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona; y los resultados fueron también positivos (Lopez-Hernandez et al., 2011b).

### 5.3 Estudio de las mutaciones de *GLIALCAM* encontradas en pacientes de MLC en células HeLa.

Tras haber sido capaces de demostrar la interacción entre MLC1 y GlialCAM quisimos estudiar qué era lo que pasaba con las mutaciones encontradas en los pacientes (Figura 59).

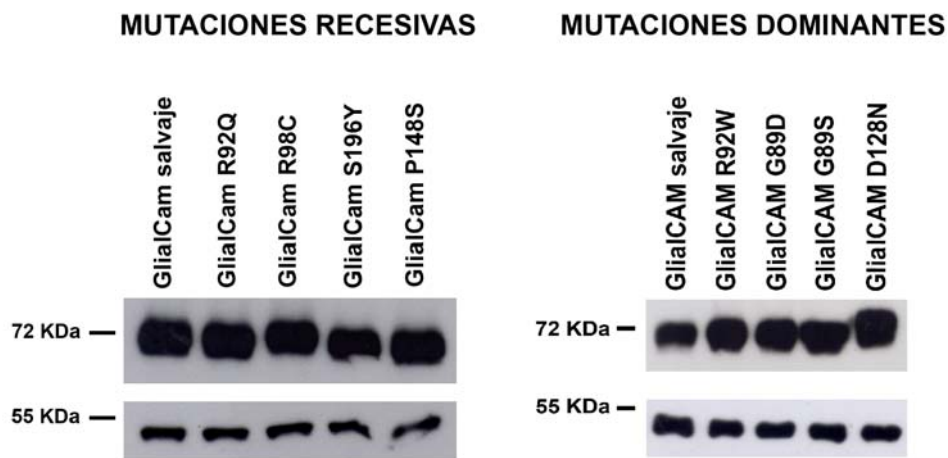


**Figura 59: Representación esquemática de los dominios de GlialCAM y posición de las mutaciones puntuales encontradas en los pacientes de MLC sin mutaciones en MLC1.** La posición de los distintos dominios fue predicho con programas como PFAM, SOSUI, and SignalP 3.0. PS: péptido señal. TMM: dominio transmembrana. Ig: dominio inmunoglobulina. Las mutaciones dominantes están destacadas en rojo; y las recesivas, en azul.

Como puede observarse en la figura 59, todas las mutaciones, salvo la W263X se localizan en la parte extracelular de GlialCAM, y cabe destacar que las mutaciones dominantes encontradas afectan exclusivamente al dominio inmunoglobulina IgV. De todas las mutaciones encontradas en los 40 pacientes analizados, se procedió al clonaje y al estudio bioquímico de 10 de ellas (Tabla 5).

MUTACIONES RECESIVAS	MUTACIONES DOMINANTES	Tabla 5: Mutaciones en GLIALCAM elegidas para ser estudiadas bioquímicamente.
L23H	R92W	
R92Q	G89D	
R98C	G89S	
P148S	D128N	
S196Y		
W263X		

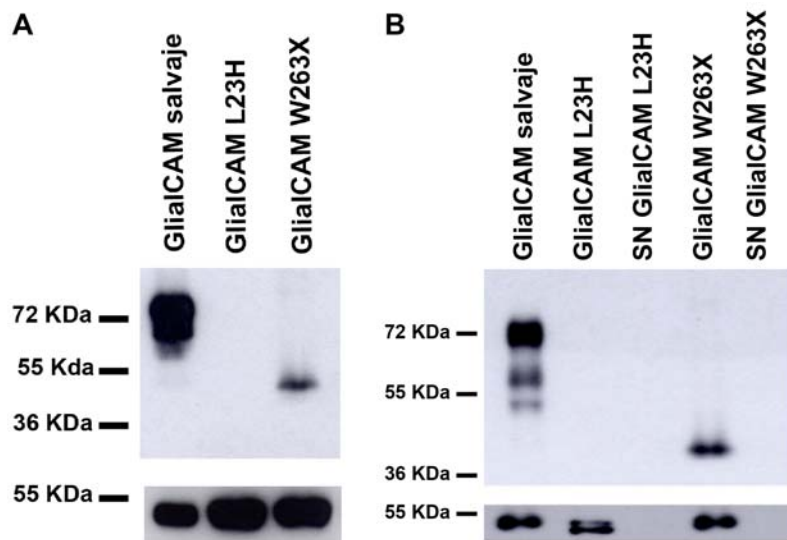
Tras el clonaje de las mutaciones mencionadas, el primer punto a estudiar fue el nivel de expresión por Western blot. Puede observarse que todas las variantes proteicas que contenían mutaciones en *GLIALCAM* presentaban un nivel de expresión similar al de la proteína salvaje (Figura 60). Esto fue observado tanto en células HeLa transfectadas como en células HEK 293.



**Figura 60: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones recesivas o dominantes en *GLIALCAM* en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB. Se observa un nivel similar de expresión respecto a la proteína GlialCAM salvaje (GlialCAM se observa en la banda de 72KDa). Control de carga realizado con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). N=5. El mismo experimento fue realizado en células HEK 293 (datos no mostrados, N=3).

Las mutación L23H afectaba al péptido señal y la W263X era un mutación de parada, por lo que la proteína quedaba truncada. Es por ello que fueron estudiadas a parte. Cuando se estudiaron sus niveles de expresión por

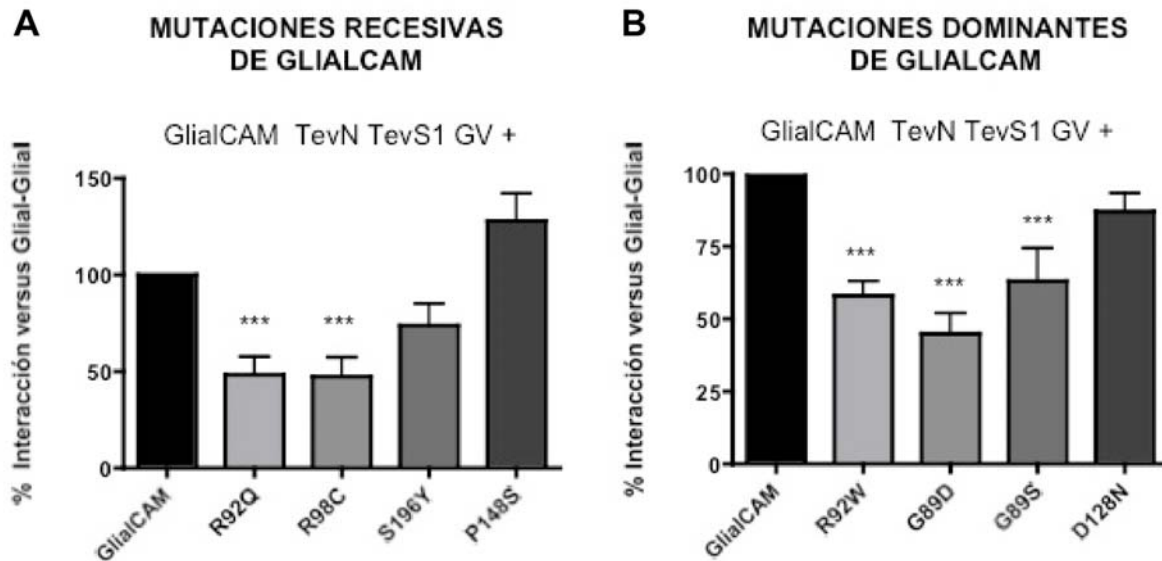
Western blot, no se detectó prácticamente señal alguna (Figura 61 A), solo un poco en el caso de la proteína que portaba la mutación de parada W263X. Pensamos que tal vez estas variantes proteicas podían estar siendo secretadas al medio. Es por ello que también se intentó detectar su expresión en el sobrenadante del medio de las células transfectadas con tales construcciones mutantes, no detectando ninguna señal en ellos (Figura 61 B).



**Figura 61: Nivel de expresión de las proteínas que portan las mutaciones recesivas severas L23H y W263X.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB. **(A)** Se observa GliAlCAM salvaje en la banda correspondiente a 72 KDa. No se observa señal para el

mutante L23H y se detecta una pequeña banda de menor peso molecular para la variante proteica W263X. **(B)** Se observa lo mismo que en (A), pero además no se detecta señal alguna en los sobrenadantes del medio de las células transfectadas con los plásmidos mutantes L23H y W263X. Control de carga realizado con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa).

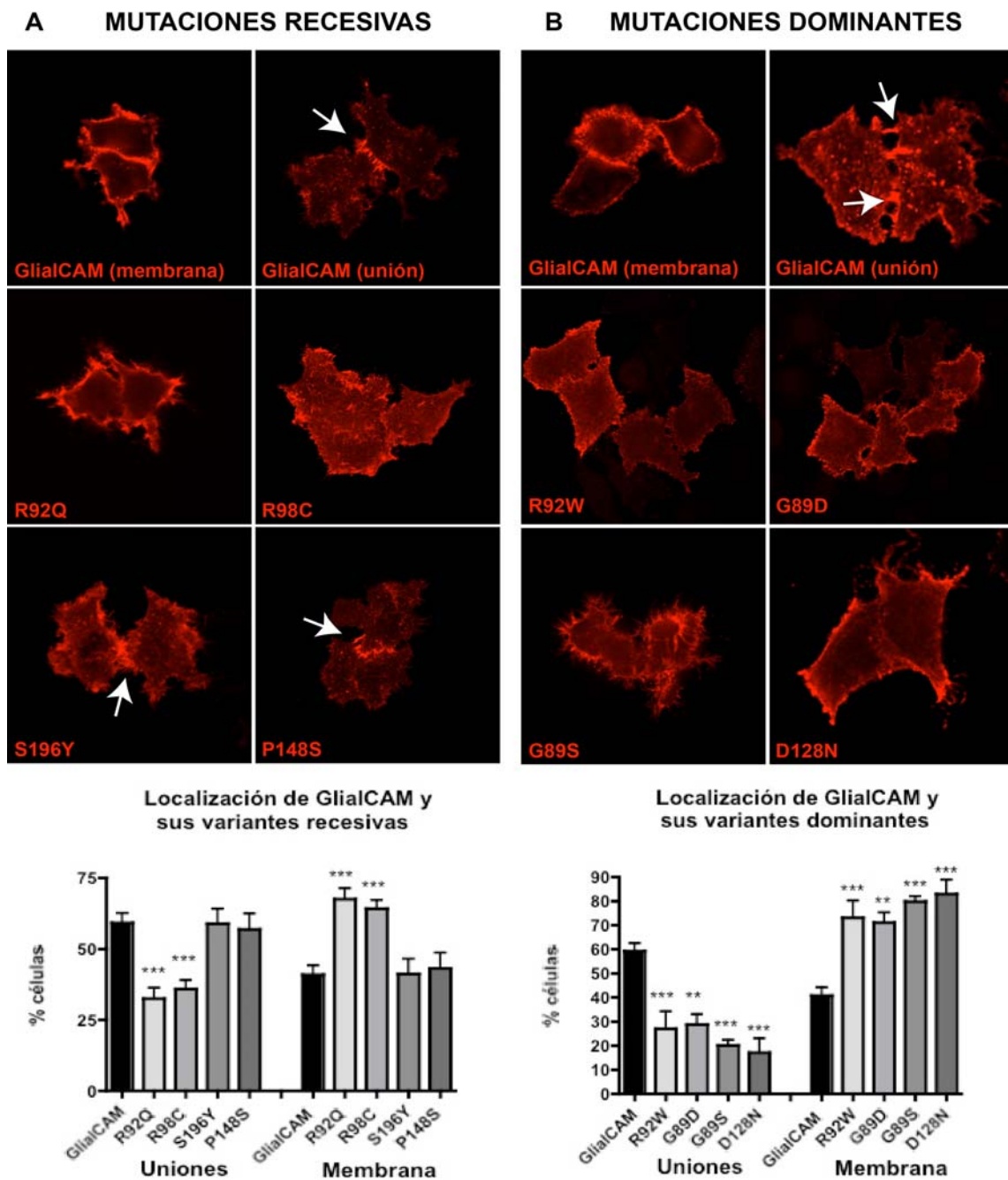
Tras el estudio por WB de las diferentes variantes portadoras de mutaciones en *GLIALCAM*, quisimos estudiar si la homo-oligomerización de GliAlCAM estaba afectada en dichas proteínas defectivas. Estos estudios se hicieron mediante ensayos de *split-TEV*, que nos permitía cuantificar el nivel de interacción. Lo que pudimos observar es que las proteínas portadoras de mutaciones en *GLIALCAM* presentaban una afectación mayoritaria en la homo-oligomerización de GliAlCAM (Figura 62). No se detectó defecto en el caso de las variantes recesivas S196Y y P148S, y en la variante dominante D128N.



**Figura 62: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC afectan a la homo-oligomerización de GlialCAM.** Células HeLA fueron co-transfectadas con las construcciones correspondientes y la interacción fue monitorizada por el ensayo de *split-TEV*. La señal obtenida para la homo-oligomerización entre moléculas de GlialCAM salvajes fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción de las variantes mutantes comparado con la interacción de la proteína salvaje + SEM. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. (\*\*\*) $P < 0,001$ . **(A)** Efecto de las mutaciones recesivas sobre la homo-oligomerización de GlialCAM. Las variantes R92Q y R98C presentan un defecto en dicha interacción. No se encontró defecto para las variantes S196Y y P148S. (N=11 para R92Q; N=10 para R98C; N=9 para S196Y; N=7 para P148S). **(B)** Efecto de las mutaciones dominantes sobre la homo-oligomerización de GlialCAM. Todas las variantes dominantes salvo la D128N, muestran un defecto en la homo-oligomerización de GlialCAM. (N=6 para R92W; N=7 para G89D; N=5 para G89S y D128N).

Asimismo, quisimos estudiar el tráfico de estas proteínas por inmunofluorescencia. Tras el análisis de muchos pares de células pudimos observar que la mayoría de las proteínas portadoras de distintas mutaciones en *GLIALCAM* mostraban un defecto en su tráfico celular, puesto que llegaban en menor medida a los contactos célula-célula, quedando en mayor instancia en la membrana plasmática en comparación con la proteína salvaje (Figura 63). No se encontró defecto para las variantes recesivas S196Y y P148S.

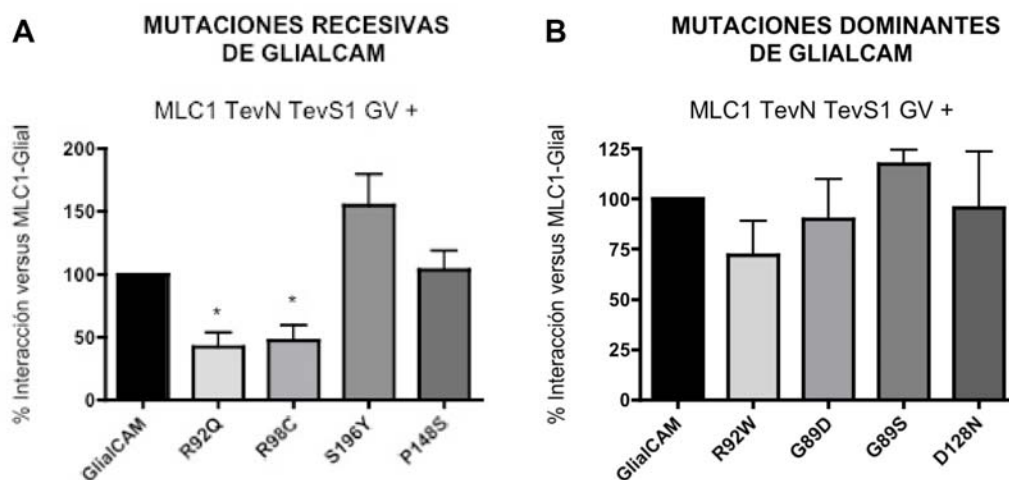




**Figura 63: Defecto en el tráfico celular de las proteínas defectivas de GlialCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con GlialCAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan las mutaciones recesivas (A) o dominantes (B) causantes de MLC. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra GlialCAM). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa *Image J* para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 4-11 experimentos independientes+SEM. (GlialCAM: N=11, 954 células. R92Q: N=5, 744 células. R98C: N=5, 644 células. S196Y: N=5, 718 células. P148S: N=7, 642 células. R92W: N=4, 460 células. G89D: N=4, 433 células. G89S: N=5, 597 células. D128N: N=9, 599 células). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni comparando la localización de la proteína salvaje frente a las variantes mutadas. \*\*\*p<0,001. \*\*p<0,01.

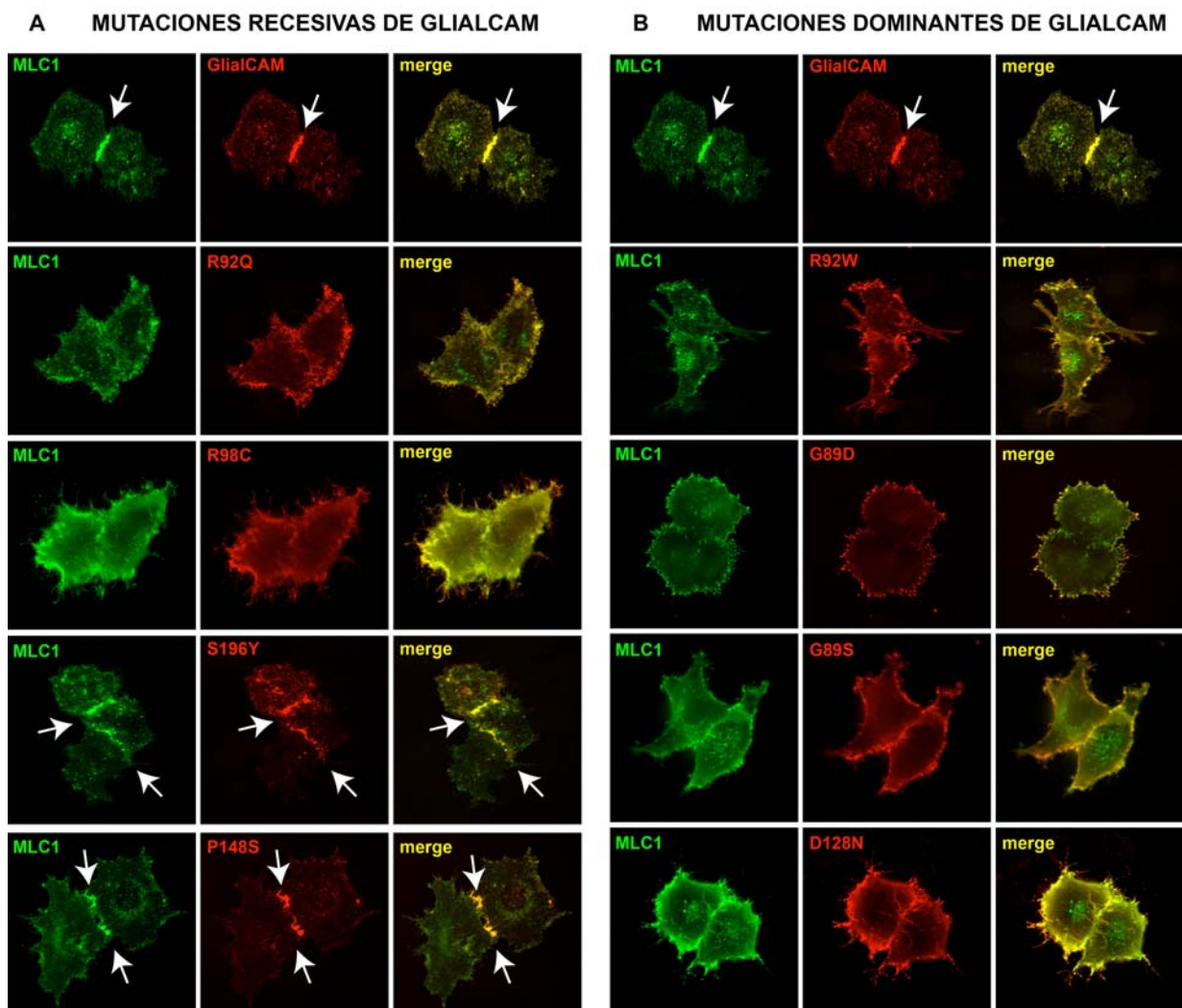


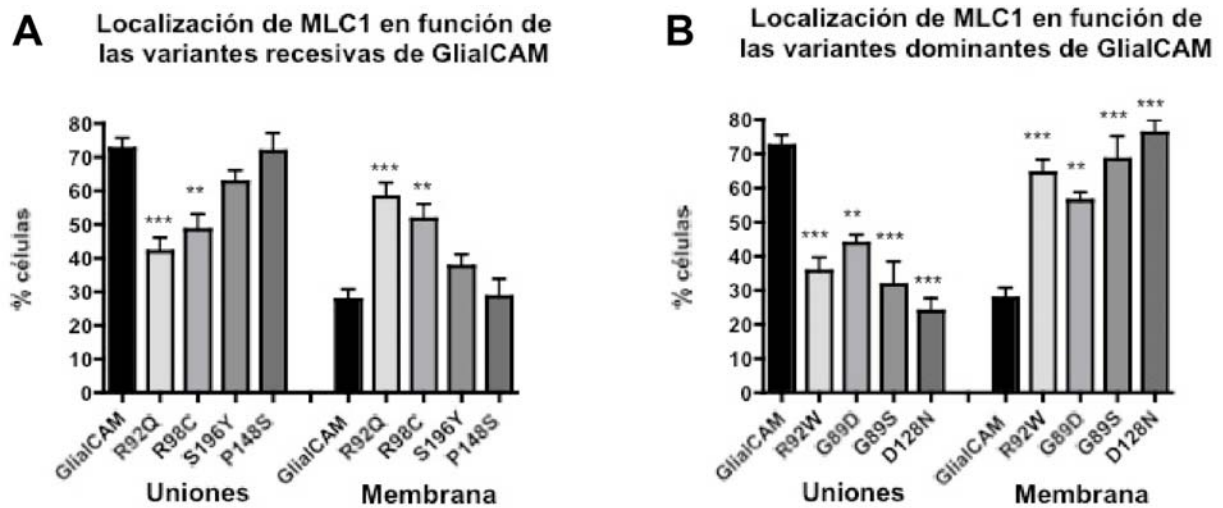
Por otro lado, después de observar que las mutaciones en *GLIALCAM* daban lugar a una menor homo-oligomerización y a una menor llegada a los contactos célula-célula en comparación con la proteína salvaje, quisimos estudiar si la interacción (de estas variantes portadoras de mutaciones en *GLIALCAM*) con MLC1 se veía también afectada, ya sea a nivel de interacción como a nivel del tráfico celular. Así, tras estudiar por *split-Tev* el nivel de interacción de las variantes de GlialCAM portadoras de mutaciones tanto recesivas como dominantes, vimos que todas las variantes, salvo la R92Q y R98C, presentaban una hetero-interacción con MLC1 similar a la que presentaba la proteína salvaje (Figura 64), con lo que se podía decir que la interacción entre MLC1 y las variantes de GlialCAM no se veía afectada en la mayoría de los casos.



**Figura 64: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC casi no afectan a la hetero-interacción con MLC1.** Células HeLA fueron co-transfectadas con las construcciones correspondientes y la interacción fue monitorizada por el ensayo de *split-TEV*. La señal obtenida para la hetero-interacción entre MLC1 y moléculas de GlialCAM salvajes fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción de las variantes mutantes comparado con la interacción de la proteína salvaje + SEM. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. (\* $P < 0,05$ ). **(A)** Efecto de las mutaciones recesivas sobre la hetero-interacción entre MLC1 y GlialCAM. Las variantes R92Q y R98C presentan un defecto en dicha interacción. No se encontró defecto para S196Y y P148S. (N=9 para R92Q; N=11 para R98C; N=9 para S196Y; N=7 para P148S). **(B)** Efecto de las mutaciones dominantes sobre la hetero-interacción entre MLC1 y GlialCAM. Todas las variantes dominantes no presentan defecto en dicha interacción. (N=8 para R92W; N=6 para G89D; N=5 para G89S; N=6 para D128N).

A pesar de no haber encontrado un defecto claro en el grado de interacción entre MLC1 y las variantes de GlialCAM por este método (*split-TEV*), quisimos estudiar también dicha interacción por inmunofluorescencia. Después de analizar pares de células para cada caso, pudimos observar que MLC1 llegaba en menor medida a los contactos célula-célula cuando era co-transfectado con las proteínas de GlialCAM portadoras de las mutaciones que daban lugar a MLC en comparación a cuando era co-transfectado con GlialCAM salvaje, en cuyo caso se concentraba predominantemente en las uniones entre células (Figura 65). Nuevamente, no se observaba un defecto en el tráfico de MLC1 cuando era co-transfectado con las variantes S196Y y P148S.

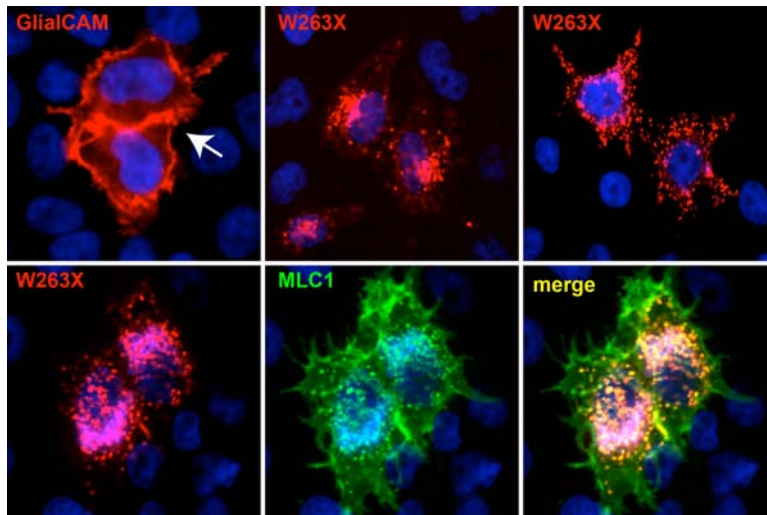




**Figura 65: MLC1 sigue la localización de las variantes de GlialCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con MLC1 y con GlialCAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan las mutaciones recesivas (A) o dominantes (B) causantes de MLC. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 4-8 experimentos independientes + SEM. MLC1 (+GlialCAM) fue detectado en un 71,5 + 3,6% en uniones versus 25,3 + 3,6% en la membrana plasmática (646 células); MLC1 (+R92Q) fue detectado en un 41,9 + 4,4% en uniones versus a un 54 + 6% en la membrana plasmática (697 células) ; MLC1 (+R98C) fue detectado en un 41,9 + 4,4% en uniones versus a un 54 + 6% en la membrana plasmática (688 células); MLC1 (+S196Y) fue detectado en un 62,5 + 4% en uniones versus a un 37,5+4% en la membrana plasmática (281 células); MLC1 (+P148S) fue detectado en un 71,6 + 5,8% en uniones versus a un 28,4 + 5,8% en la membrana plasmática (332 células); MLC1 (+R92W) fue detectado en un 5,6 + 4,5% en uniones versus a un 63,8 + 4,8% en la membrana plasmática (455 células); MLC1 (+G89D) fue detectado en un 43,8 + 2,8% en uniones versus a un 56,2 + 2,8% en la membrana plasmática (444 células); MLC1 (+G89S) fue detectado en un 31,6 + 7,3% en uniones versus a un 68,4 + 7,3% en la membrana plasmática (344 células); MLC1 (+D128N) fue detectado en un 23,8 + 4% en uniones versus a un 76,1 + 4% en la membrana plasmática (264 células). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni comparando la localización de MLC1 cuando era co-transfectado con la proteína salvaje frente a cuando lo era con las variantes mutadas. \*\*\*p<0,001. \*\*p<0,01.

Asimismo, también quisimos estudiar el comportamiento por inmunofluorescencia de la variante severa W263X, debido a que fuimos capaces de detectar una banda (aunque de menor peso molecular que la proteína GlialCAM salvaje) por WB (recordar Figura 61). Lo que observamos fue que la proteína quedaba prácticamente retenida intracelularmente y no era capaz de alcanzar la membrana plasmática. Cuando co-transfectábamos MLC1

con dicha variante, MLC1 no era capaz de concentrarse en los contactos célula-célula, como ocurría con la proteína GlialCAM salvaje (Figura 66). La variante L23H también fue estudiada por inmunofluorescencia pero no se detectó señal alguna (dato no mostrado).



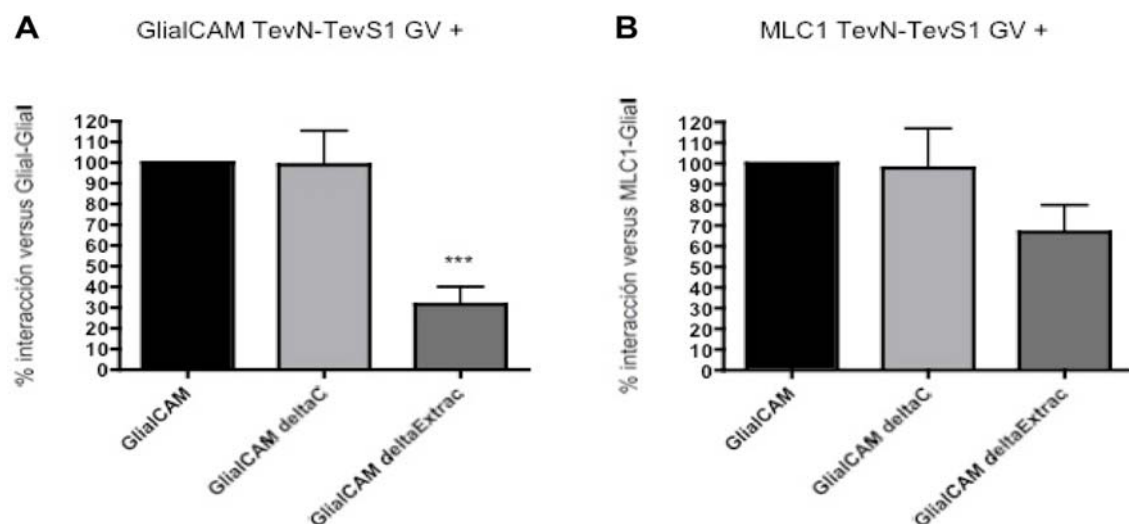
**Figura 66:** La variante W263X presenta un tráfico intracelular alterado severo, puesto que no es capaz de alcanzar ni la membrana plasmática ni las uniones célula-célula. Células HeLa fueron transfectadas con GlialCAM salvaje, con el plásmido que porta la mutación recesiva severa W263X o con MLC1 más las construcciones antes mencionadas. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron

inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. La flecha indica los contactos célula-célula. Se observa que la variante W263X se queda totalmente retenido intracelularmente y no es capaz de llegar a la membrana plasmática. Cuando es co-transfectada con MLC1, MLC1 no se localiza en las uniones celulares, como ocurre predominantemente cuando es co-transfectado con la proteína GlialCAM salvaje.

#### 5.4 Análisis de dos formas de GlialCAM delecionadas para intentar encontrar dominios de interacción.

Después de haber estudiado las diferentes variantes mutadas de GlialCAM presentes en pacientes de MLC sin mutaciones en *MLC1*, quisimos intentar ahondar en los posibles dominios que pueden ser importantes para concentrar a las moléculas de GlialCAM en los contactos célula-célula, así como el posible lugar de interacción con MLC1, necesario para dirigirla a dichas uniones celulares. Para ello, decidimos construir dos proteínas variantes de GlialCAM delecionando por un lado la cola citoplasmática; y por otro lado, eliminando toda la parte extracelular (aunque dejamos la secuencia

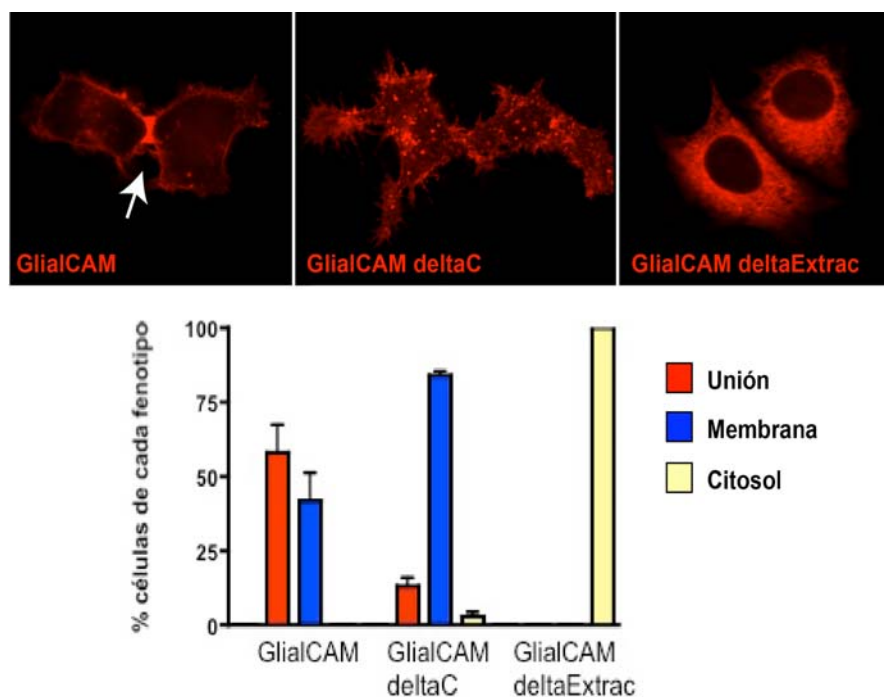
correspondiente al péptido señal para mantener la topología). Con estas variantes quisimos estudiar por *split-TEV* la homo-oligomerización con GlialCAM y la hetero-interacción con MLC1 para ver si la interacción se veía afectada. Lo que pudimos observar fue que la proteína con el dominio extracelular deletado presentaba una menor capacidad para homo-oligomerizar con GlialCAM y para hetero-interaccionar con MLC1 que en el caso de la proteína GlialCAM salvaje, siendo en el primer caso significativa. En cambio, la variante proteica a la que se había eliminado la cola citoplasmática era capaz de homo-oligomerizar con GlialCAM e interaccionar con MLC1 de la misma manera que lo hacía GlialCAM salvaje (Figura 67).



**Figura 67: Efecto del dominio citoplasmático y extracelular de GlialCAM en la homo-oligomerización consigo mismo y en la interacción con MLC1.** Células HeLA fueron co-transfectadas con las construcciones correspondientes y la interacción fue monitorizada por el ensayo de *split-TEV*. **(A)** La señal obtenida para la homo-oligomerización entre moléculas de GlialCAM salvaje fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción de las 2 variantes quiméricas comparado con la interacción de la proteína salvaje + SEM. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. (\*\*\*) $P < 0,001$  entre la interacción GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-GlialCAM deltaExtracelular,  $N=9$ . No hay diferencias significativas entre la interacción GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-GlialCAM deltaC,  $N=8$ ). **(B)** La señal obtenida para la hetero-interacción entre MLC1 y moléculas de GlialCAM salvajes fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción con MLC1 de las 2 proteínas mutantes comparado con la interacción de MLC1 con la proteína salvaje + SEM. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. No hay diferencias significativas entre la interacción GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-GlialCAM deltaC,  $N=7$  ni entre GlialCAM-GlialCAM deltaExtracelular,  $N=10$ ).

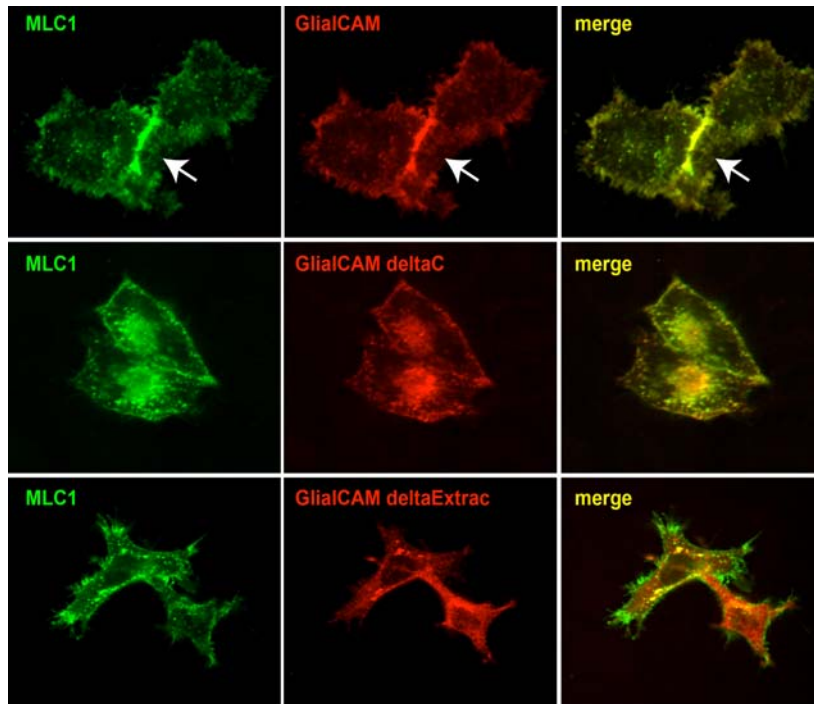


No obstante, quisimos estudiar estas variantes por inmunofluorescencia. Lo que observamos fue que la proteína con el dominio extracelular delecionado quedaba totalmente retenida intracelularmente, sin ser capaz de llegar siquiera a la membrana plasmática. En cambio, la otra proteína sin el dominio citoplasmático, era capaz de llegar a la membrana plasmática, pero no se concentraba en las uniones celulares como lo hacía la proteína GlialCAM salvaje (Figura 68).



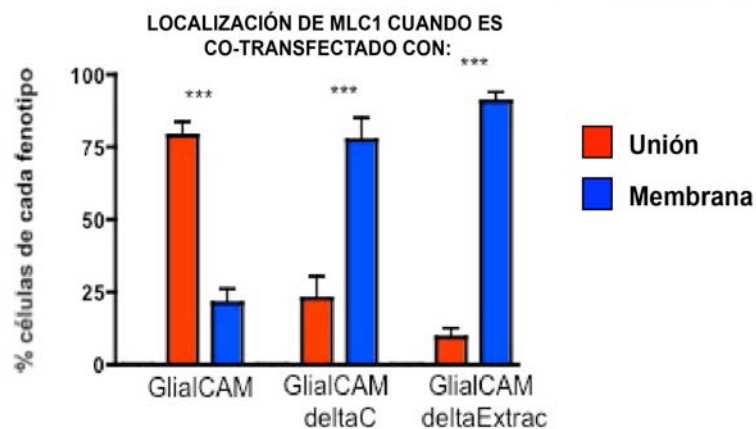
**Figura 68: Defecto en el tráfico celular de las 2 proteínas quiméricas de GlialCAM defectivas de la cola citoplasmática o el dominio extracelular.** Células HeLa fueron transfectadas con GlialCAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan la deleción del dominio citoplasmático (GlialCAM deltaC) o la deleción del dominio extracelular (GlialCAM deltaExtrac). Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones, se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones), o se quedaba retenida intracelularmente sin ser capaz de alcanzar la membrana. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes + SEM. (GlialCAM: 238 células. GlialCAM deltaC: 250 células. GlialCAM deltaExtrac: 124 células). \*\*\* $p < 0,001$ . Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni y da esta significación cuando comparamos la localización de la proteína salvaje en uniones frente al % de células localizadas en la membrana de la proteína GlialCAM salvaje frente a las variantes mutadas. En el caso del % de células de GlialCAM salvaje en el citosol, existe significancia (\*\*\*) cuando lo comparamos con GlialCAM deltaExtrac.

Asimismo, también quisimos estudiar por inmunocitoquímica la localización que seguía MLC1 cuando era co-transfectado con estas variantes de GlialCAM. Con ambas, MLC1 dejaba de concentrarse en las uniones (Figura 69).



**Figura 69: MLC1 no se concentra en las uniones celulares cuando es co-transfectado con las variantes delecionadas de GlialCAM.** Células HeLa fueron transfectadas con MLC1 y con GlialCAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan la deleción del dominio citoplasmático (GlialCAM deltaC) o la deleción del dominio extracelular (GlialCAM deltaExtrac). Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron

inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de

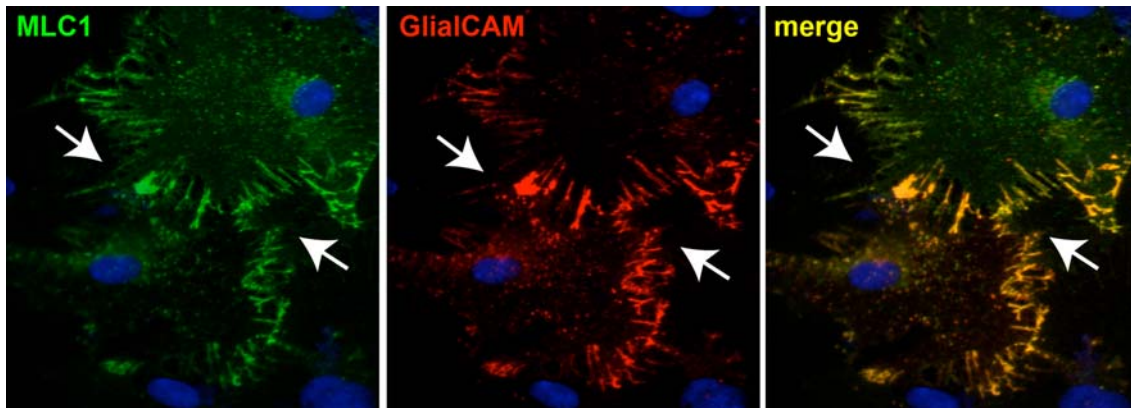


células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si MLC1 se concentraba en uniones o no (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa *Image J* para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media de entre 4 a 6 experimentos independientes + SEM. (MLC1+GlialCAM: 151 células, N=6. MLC1+GlialCAM deltaC: 199 células, N=4. MLC1+GlialCAM deltaExtrac: 116 células, N=4). \*\*\*p<0,001. Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni y da esta significación cuando comparamos la localización de la proteína salvaje en uniones frente al % de células localizadas en uniones en el caso de las otras dos proteínas quiméricas. Lo mismo si comparamos el % de células localizadas no en uniones de la proteína GlialCAM salvaje frente a las variantes mutadas. Además, también es significativo (\*\*\*) el % de células que está en uniones versus las que no están para cada proteína independiente (GlialCAM, GlialCAM deltaC y GlialCAM deltaExtrac).

### **5.5 Estudios de las mutaciones de *GLIALCAM* encontradas en pacientes de MLC en cultivos primarios de astrocitos.**

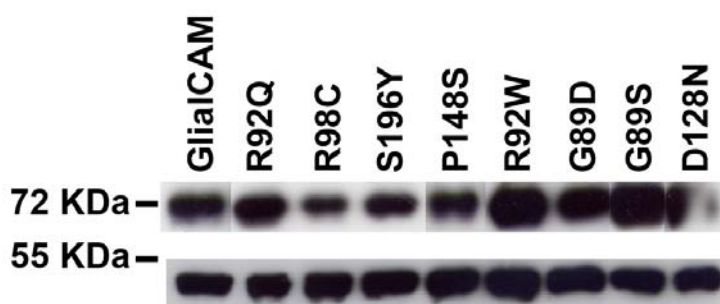
Tras llevar a cabo los estudios bioquímicos en células HeLa nos planteamos llevar a cabo el mismo tipo de estudios en un sistema celular más cercano al real, como era el cultivo primario de astrocitos, ya que tanto MLC1 como GlialCAM se expresan en astrocitos endógenamente y en ambos casos se localizan en las uniones astrocitarias (Duarri et al., 2011) y (Favre-Kontula et al., 2008). Por tanto, queríamos estudiar si las mutaciones presentes en *GLIALCAM* causantes de MLC presentaban también un defecto en la localización habitual de MLC1. Sin embargo, aquí nos encontramos con algunos problemas técnicos, puesto que cuando co-transfectábamos las variantes mutadas de *GLIALCAM* con MLC1, debido al bajo nivel de transfección que presentan los astrocitos, nos era difícil encontrar el suficiente número de pares de células transfectadas con las dos proteínas para poder realizar el tipo de estudios bioquímicos que habíamos llevado a cabo en las células HeLa. Es por ello que decidimos construir adenovirus para GlialCAM y para cada una de las variantes recesivas y dominantes anteriormente estudiadas, ya que así conseguiríamos obtener un mayor nivel de transfección y podríamos solventar el problema anteriormente comentado. Lo primero que testamos era si la transducción con el adenovirus que expresaba GlialCAM salvaje permitía que la proteína fuera capaz de llegar a la membrana y a las uniones astrocitarias como estaba descrito en la literatura. Pudimos comprobar que no solo era capaz de llegar a dichas uniones entre astrocitos, sino que además, co-localizaba en ellas con MLC1 (Figura 70).





**Figura 70: Localización subcelular de MLC1 y GlialCAM en cultivo primario de astrocitos.** Astrocitos fueron co-infectados con adenovirus que expresaban MLC1 (humano y con 2 epítopos HA) y con GlialCAM salvaje (con 3 epítopos Flag) a MOI 2,5. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.

Tras comprobar que el adenovirus de GlialCAM salvaje era capaz de llegar a las uniones astrocitarias, quisimos estudiar qué pasaba en los astrocitos con el conjunto de variantes mutadas de *GLIALCAM* causantes de MLC. En primer lugar estudiamos su nivel de expresión por Wester blot. Pudimos observar que dichas variantes mostraban un nivel de expresión similar a GlialCAM salvaje, como ocurría también en células HeLa o HEK transfectadas (Figura 71)

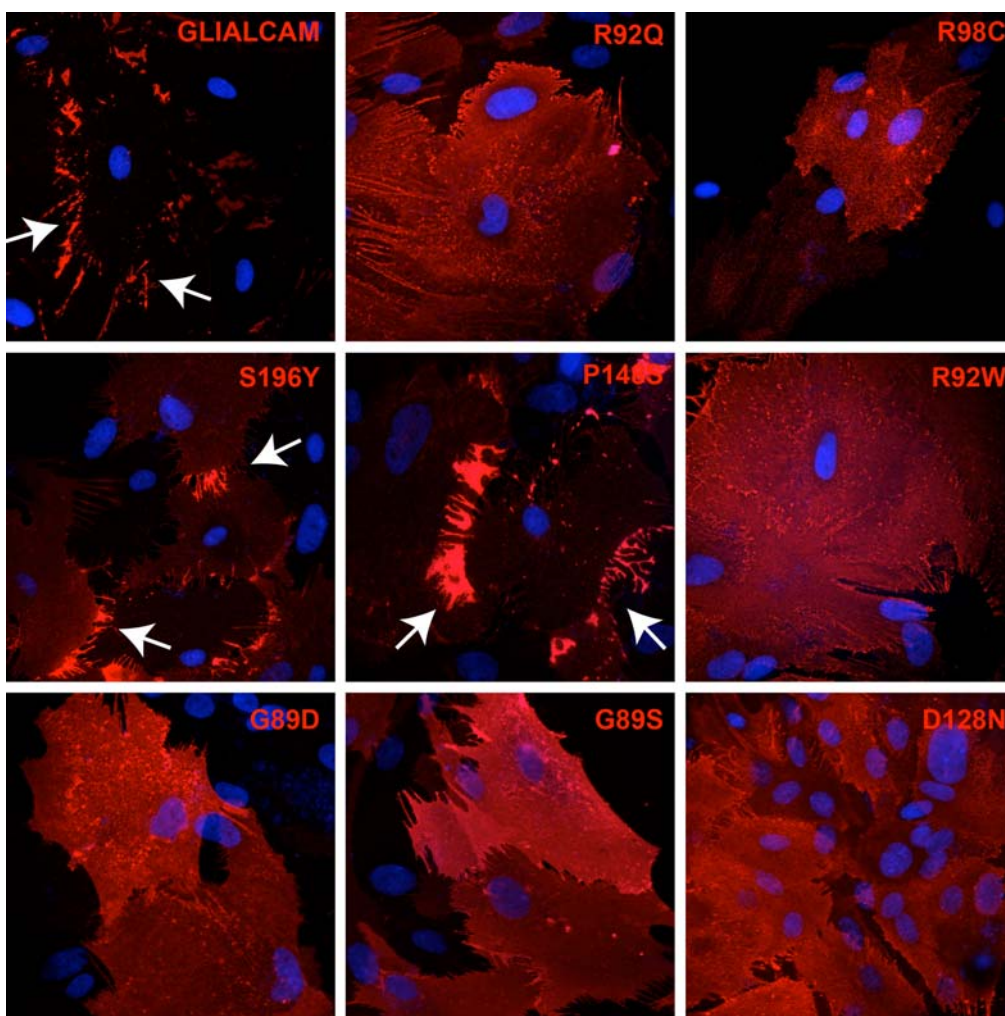


**Figura 71: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones recesivas o dominantes en *GLIALCAM* en astrocitos primarios.**

Astrocitos primarios fueron infectados con adenovirus que expresan las construcciones correspondientes y tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron

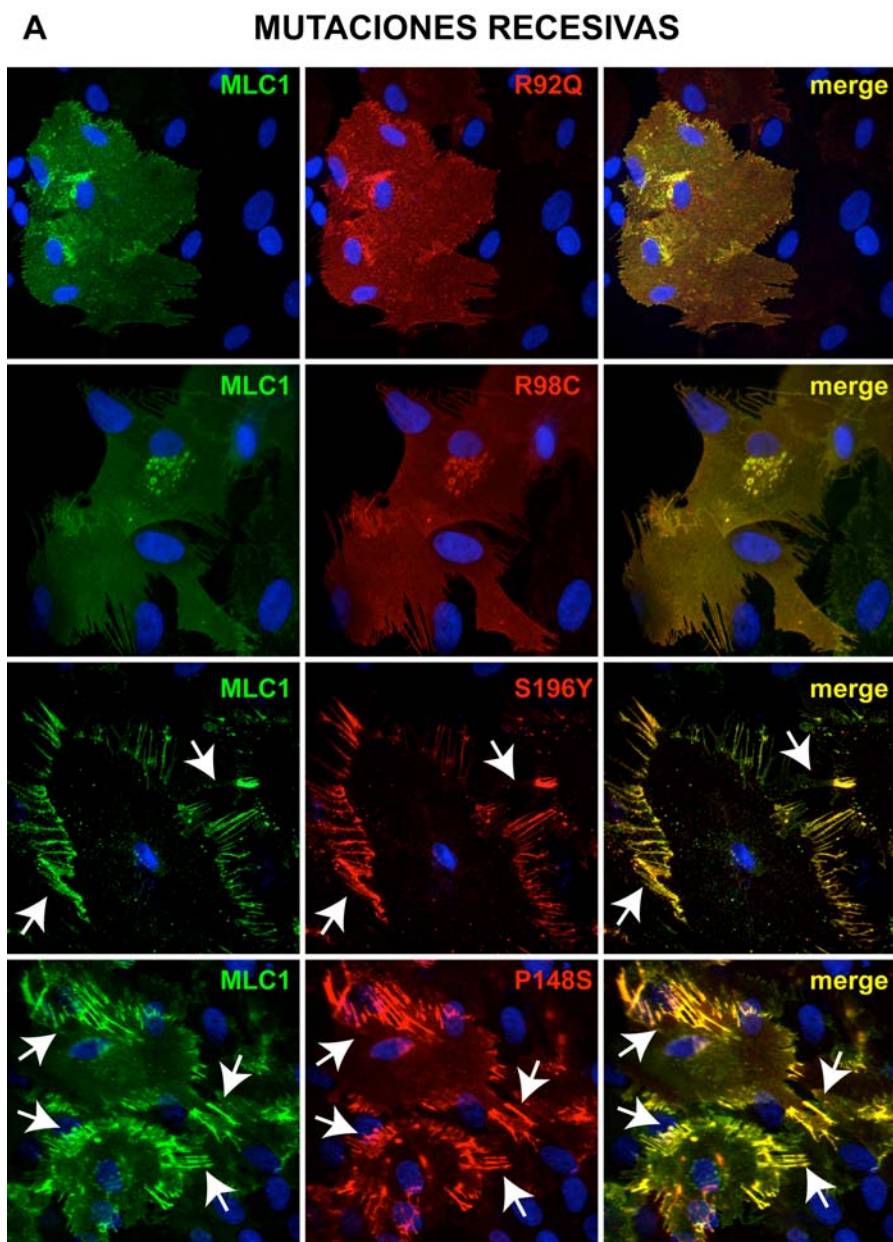
analizados por WB. Se observa un nivel similar de expresión respecto a la proteína GlialCAM salvaje (GlialCAM y variantes se observan en la banda de 72 KDa). Control de carga realizado con anti  $\beta$  Actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). N=3

El siguiente paso fue estudiar dichas variantes por inmunofluorescencia en astrocitos. En este caso, pudimos detectar en la mayoría de los casos, otro tipo de localización respecto a la proteína salvaje, pues aunque en algunas ocasiones eran capaces de alcanzar la membrana plasmática, no eran capaces de concentrarse en las uniones astrocitarias. Además, presentaban un marcaje difuso intracelular (Figura 72). Nuevamente, no se encontró defecto para las variantes S196Y y P148S.

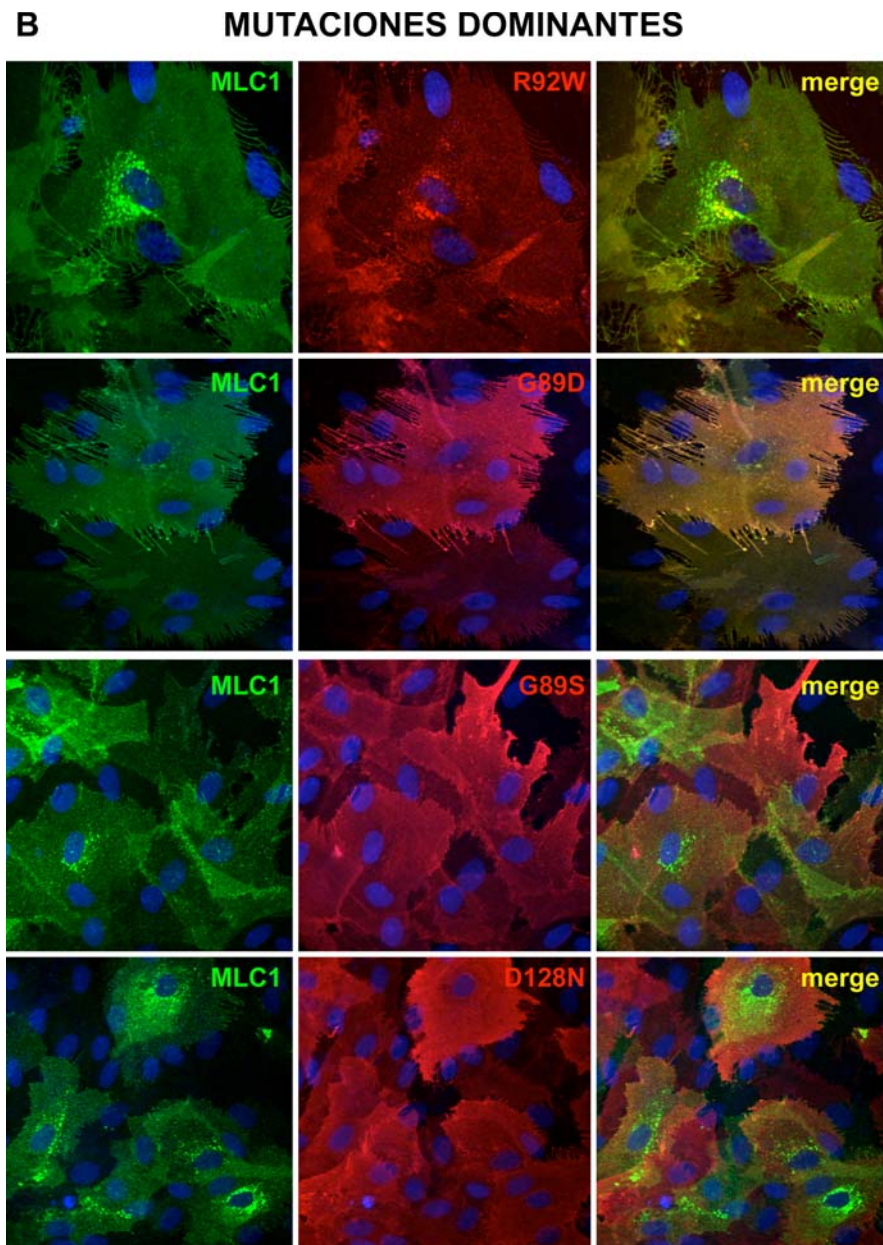


**Figura 72: Cambios en la localización subcelular de las variantes mutantes de GLIALCAM en cultivo primario de astrocitos.** Astrocitos fueron infectados con adenovirus que expresan GlialCAM salvaje o GlialCAM que contiene las mutaciones recesivas R92Q, R98C, S196Y y P148S; o las mutaciones dominantes R92W, G89D, G89S y D128N, todas ellas con 3 epítomos Flag a MOI 3. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítomo Flag. Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

Posteriormente quisimos estudiar también si el tráfico de MLC1 se veía alterado cuando era co-infectado con las variantes que expresaban las mutaciones descritas en *GLIALCAM* en los pacientes afectos de MLC. Lo que pudimos detectar fue que MLC1 seguía el tráfico de las variantes de GlialCAM, ya que no era capaz de concentrarse en las uniones astrocitarias como ocurría en el caso de GlialCAM salvaje, donde además co-localizaban (ver Figura 70). No se observó defecto en MLC1 cuando era co-infectado con las variantes que expresaban las mutaciones S196Y y P148S (Figura 73).

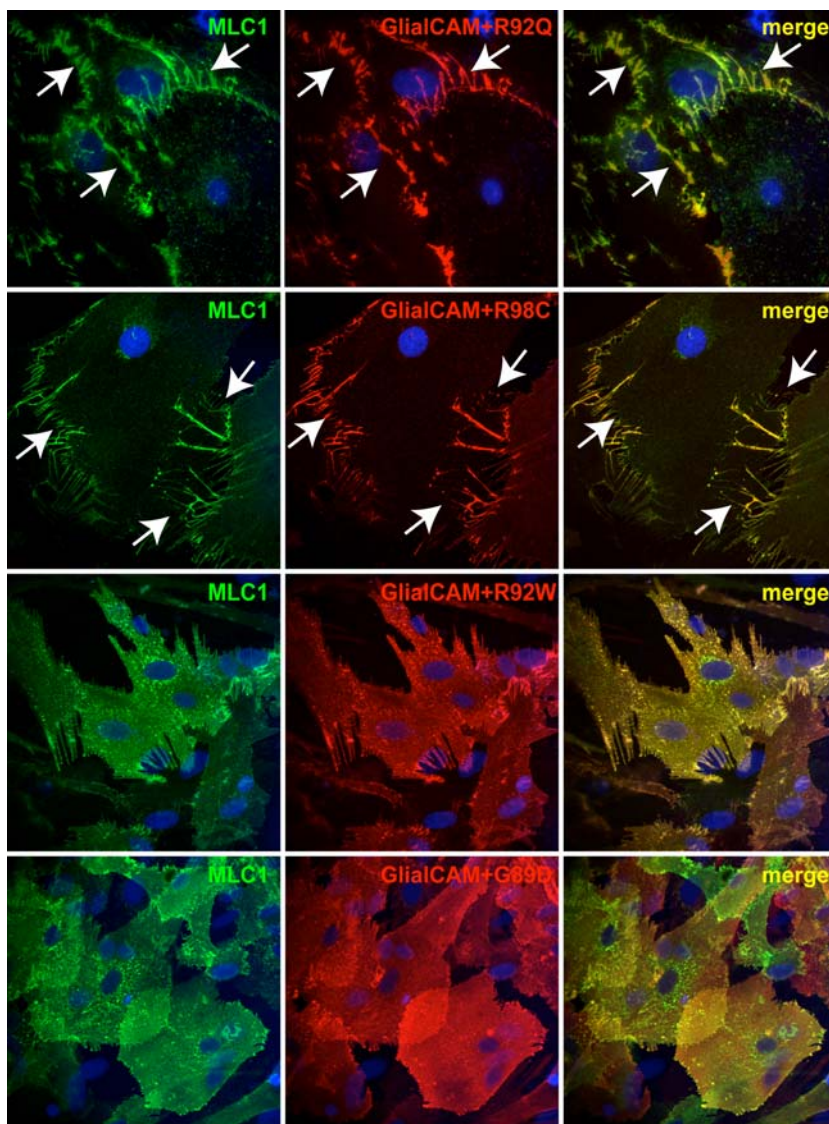






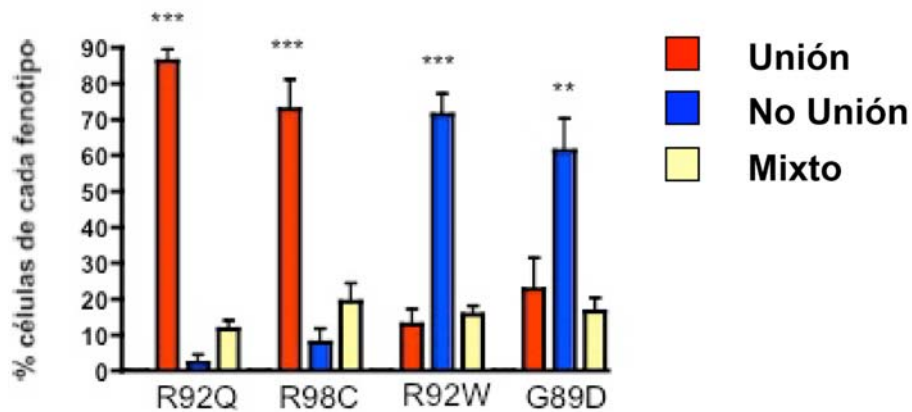
**Figura 73: MLC1 ve alterado su tráfico cuando es co-infectado con las variantes mutantes de GLIALCAM en cultivo primario de astrocitos.** Astrocitos fueron infectados con adenovirus que expresan MLC1 más GlialCAM salvaje; o GlialCAM que contiene las mutaciones recesivas **(A)** R92Q, R98C, S196Y y P148S; o las mutaciones dominantes **(B)** R92W, G89D, G89S y D128N, a MOI 3. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. MLC1 se localiza principalmente de manera difusa en el interior celular y aunque alcance en algunos casos la membrana plasmática, no se concentra en las uniones astrocitarias, salvo en el caso de las variantes S196Y y P148S, que sí es capaz de concentrarse en ellas. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

A pesar de estos resultados seguíamos sin entender por qué unas mutaciones eran recesivas y otras dominantes. Es por ello que se nos ocurrió hacer en astrocitos experimentos para estudiar el modo de herencia de las mutaciones bioquímicamente. Así, infectamos astrocitos con niveles iguales de GlialCAM salvaje y GlialCAM que contenía mutaciones recesivas (como la R92Q y R98C), o dominantes (como la R92W y G89D), junto con MLC1; y analizamos la localización de MLC1 y GlialCAM por inmunofluorescencia. Lo que pudimos observar es que GlialCAM salvaje era capaz de rescatar el defecto en el tráfico de MLC1 que causaban las mutaciones recesivas (ver Figura 73 A), pero no rescataba la deslocalización de MLC1 causado por las mutaciones dominantes (Figura 74).



**Figura 74:** Comportamiento en la localización de MLC1 tras co-infectar con niveles iguales de GlialCAM salvaje y variantes mutantes de *GLIALCAM*. Astrocitos fueron co-infectados con MLC1, GlialCAM salvaje y GlialCAM que portaba mutaciones recesivas (R92Q ó R98C) ó dominantes (R92W ó G89D) a un ratio de MOI 3:2:2, observándose que la localización de MLC1 era rescatada en el caso de que la mutación fuera recesiva pero no dominante. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y luego se realizaron inmunofluorescencias contra MLC1 (verde) y contra GlialCAM (rojo). La co-localización es mostrada en amarillo (merge).

Para cuantificar esto, se tomaron imágenes aleatorias y se contó manualmente el porcentaje de células localizadas en uniones (rojo), no en uniones (azul) o con un fenotipo mixto (amarillo, localizado parcialmente en uniones y no en uniones) (Figura 82).



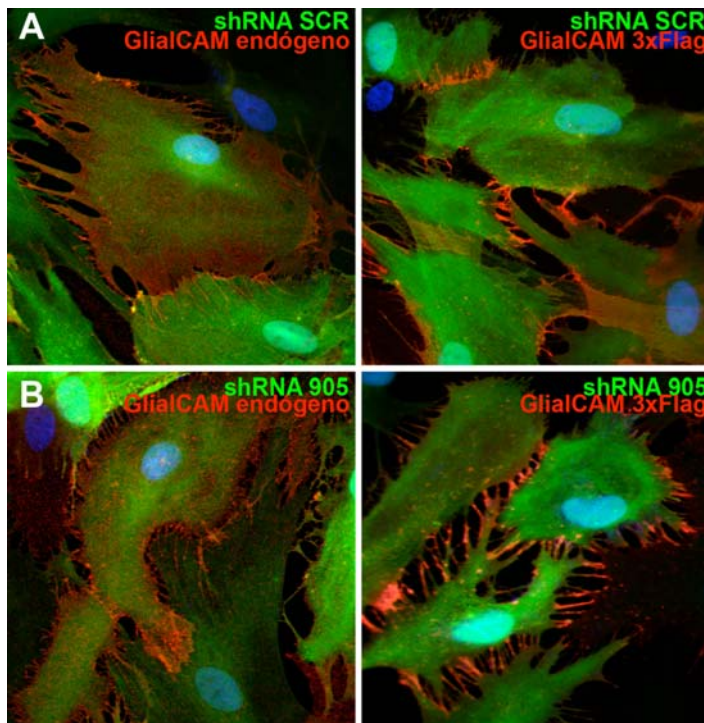
**Figura 75: Comportamiento en la localización de MLC1 tras co-infectar con niveles iguales de GlialCAM salvaje y variantes de GlialCAM mutantes.** Astrocitos fueron co-infectados con MLC1, GlialCAM salvaje y GlialCAM que portaba mutaciones recesivas (R92Q ó R98C) ó dominantes (R92W ó G89D) a un ratio de MOI 3:2:2, observándose que la localización de MLC1 era rescatada en el caso de que la mutación fuera recesiva pero no dominante. Se realizaron inmunofluorescencias y se tomaron imágenes aleatorias. Se cuantificó manualmente el porcentaje de células localizadas en uniones (rojo), no en uniones (azul) o con un fenotipo mixto (amarillo, localizado parcialmente en uniones y no en uniones) + SEM. El test de comparación múltiple de Bonferroni fue utilizado comparando “uniones” versus “no uniones” (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). N=4.

## 5.6 Otros estudios de GlialCAM en cultivos primarios de astrocitos.

También quisimos estudiar qué le podía pasar a GlialCAM en un modelo astrocitario con una reducida expresión de MLC1. Esto pudimos hacerlo ya que en el grupo se había puesto a punto dicho modelo gracias a la metodología del RNA de interferencia (Duarri et al., 2011). Se infectaron astrocitos diferenciados con adenovirus que expresaban la secuencia control *Scrambled* (SCR) o la secuencia 905 (contra MLC1) a MOI 5. Tras 7 días, los astrocitos fueron procesados por Western blot (datos no mostrados, pero que muestran que aunque MLC1 desaparezca, el nivel de expresión de GlialCAM se mantiene constante, tanto en astrocitos con MLC1 como en astrocitos sin MLC1 (Lopez-



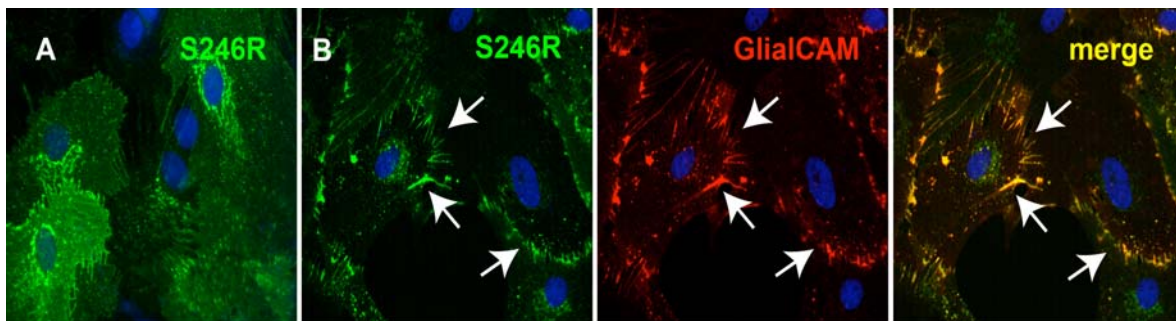
Hernandez et al., 2011b). Esto fue realizado por mi compañero de laboratorio Xavier Capdevila). Por inmunofluorescencia pudimos observar que GlialCAM era capaz igualmente de llegar a la membrana plasmática así como a los contactos astrocitarios (Figura 76), demostrando que la localización de GlialCAM era independiente de MLC1. Asimismo, también quisimos detectar por inmunofluorescencia la localización de GlialCAM cuando era sobreexpresado en dichos astrocitos sin MLC1. Para ello, 3 días antes de la fijación de los astrocitos infectados con los adenovirus SCR y 905, éstos eran infectados nuevamente con adenovirus que expresaban GlialCAM salvaje con 3 epítomos Flag. En esta ocasión, GlialCAM-Flag también era capaz de localizarse en las uniones astrocitarias en los astrocitos carentes de MLC1 (Figura 76), volviendo a demostrar que la localización de GlialCAM era independiente de MLC1.



**Figura 76: Localización de GlialCAM en astrocitos primarios carentes de MLC1 gracias a la metodología del RNA de interferencia.** Tras 7 días de la infección con adenovirus que expresan la secuencia control *Scrambled* (SCR) (A) o 905 (contra MLC1) (B) los astrocitos fueron fijados y procesados por inmunofluorescencia usando anticuerpos contra GlialCAM (en rojo). Las células transducidas eran visualizadas por la señal GFP positiva. La sobre-expresión de GlialCAM-Flag era realizada 3 días antes de la fijación de las células. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Otra pregunta que nos hicimos fue si GlialCAM era capaz de mejorar el fenotipo de otras mutaciones de MLC1 en astrocitos. Decidimos analizar la

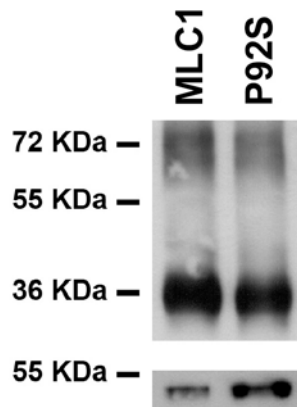
variante S246R de MLC1, ya estudiada previamente en el grupo (Duarri et al., 2008). Lo que observamos fue que cuando los astrocitos eran infectados con el adenovirus que expresaba la mutación S246R de *MLC1*, la proteína quedaba en su mayoría retenida intracelularmente (Figura 77), mientras que cuando se co-infectaban los astrocitos con dicho adenovirus y con el que expresaba GlialCAM salvaje, la variante S246R era capaz de alcanzar la membrana plasmática y las uniones astrocitarias (Figura 77), lo cual nos sugería que GlialCAM era capaz de mejorar el fenotipo de la mutación de *MLC1* S246R.



**Figura 77: GlialCAM ayuda a la variante mutante S246R de MLC1 llegar a los procesos astrocitarios.** Astrocytes fueron infectados con adenovirus que expresaban MLC1 (A), la variante mutante S246R (B) (ambos con con 2 epítopos HA) o co-infectados con GlialCAM salvaje (con 3 epítopos Flag) más la variante mutante S246R de MLC1 (C), a MOI 2,5. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítopo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

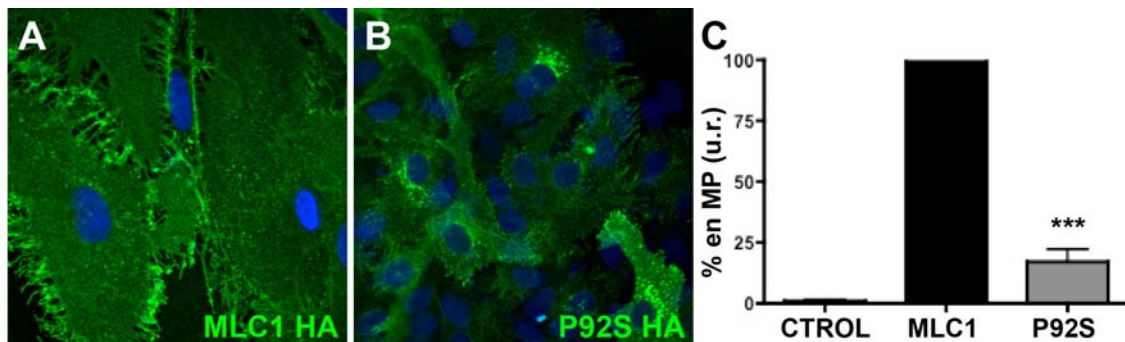
Otra mutación de MLC1 que también quisimos estudiar en astrocitos fue la variante P92S. Se quisieron hacer estudios similares a lo que ya se había hecho con la variante S246R previamente en el grupo (Duarri et al., 2008) pero en esta ocasión teniendo en cuenta a GlialCAM. Después de construir y producir el adenovirus que expresara dicha variante, se procedió en primer lugar a testar el nivel de expresión por WB en cultivo primario de astrocitos, detectándose prácticamente de igual manera que MLC1 salvaje (Figura 78).





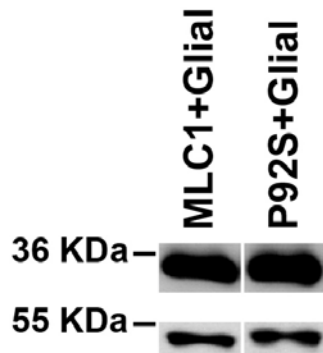
**Figura 78: Nivel de expresión de la variante mutante de MLC1 P92S en cultivo primario de astrocitos.** Astrocitos fueron infectados con adenovirus que expresaban MLC1 y la variante mutante P92S (ambos con con 2 epítomos HA) a MOI 2,5. Se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB, observándose un nivel similar de expresión entre MLC1 salvaje y P92S. El control de carga se llevó a cabo con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). N=3

Posteriormente, se estudió la localización de dicha variante tanto por inmunofluorescencia como por estudios de ELISA basados en luminiscencia para cuantificar el nivel de llegada a la membrana plasmática. Pudo observarse que la variante P92S presenta un patrón de expresión difuso por el citoplasma y en muchas ocasiones, agregado alrededor del núcleo, posiblemente en el RE (Figura 79 B). Los estudios basados en luminiscencia muestran que la variante P92S llega a la membrana plasmática alrededor de un 90% menos que en el caso de MLC1 salvaje (Figura 79 C).



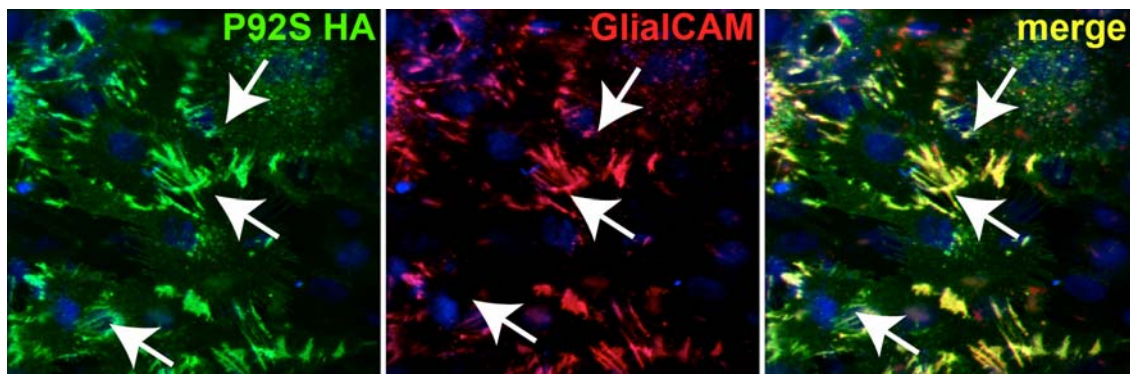
**Figura 79: Localización de la variante P92S en astrocitos primarios de rata.** Se infectaron astrocitos con adenovirus que expresan MLC1 o P92S (ambos con un epítomo HA extracelular) a MOI 2,5, y se analizaron las células por inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra MLC1. Puede verse que MLC1 es capaz de alcanzar la membrana plasmática así como los procesos astrocitarios (A). En cambio, la variante P92S (B) se localiza preferentemente intracelularmente de manera difusa (N=2). (C) Astrocitos fueron infectados con los mismos adenovirus y con las mismas condiciones, y tras 48 horas, la expresión en superficie de MLC1 y P92S (gracias al pítomo HA extracelular) fue cuantificada a través de experimentos de inmunodetección basados en bioluminiscencia usando un anticuerpo contra el epítomo HA extracelular. Se pudo observar que la variante P92S alcanza la membrana plasmática en torno a un 17% respecto a como lo hace MLC1 (N=4). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  entre MLC1 y P92S. \*  $p < 0,05$  entre P92S y CTROL.

El siguiente paso fue analizar la expresión de P92S en presencia de GlialCAM. Pudimos observar que no variaba el nivel de expresión respecto a MLC1 (Figura 80).



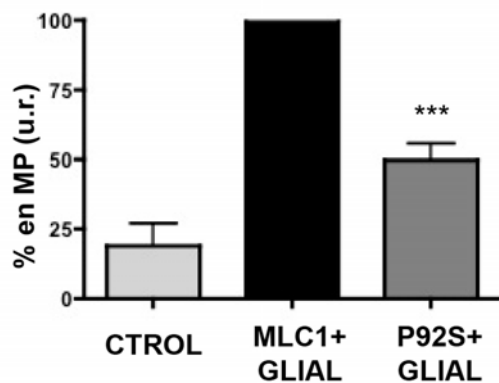
**Figura 80: Nivel de expresión de la variante mutante de MLC1 P92S en presencia de GlialCAM en cultivo primario de astrocitos.** Astrocitos fueron infectados con adenovirus que expresaban MLC1 y la variante mutante P92S (ambos con con 2 epítotos HA) a MOI 2,5 conjuntamente con GlialCAM (también a MOI 2,5). Se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB, observándose un nivel similar de expresión entre MLC1 salvaje y P92S. El control de carga se llevó a cabo con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). N=3

Sin embargo, donde si se observó un efecto de GlialCAM sobre la variante de MLC1 P92S fue en experimentos de inmunofluorescencia. Cuando se co-infectaron los astrocitos con adenovirus que expresaban MLC1 P92S conjuntamente con GlialCAM, dicha variante proteica podía detectarse en las uniones astrocitarias, aunque también quedaba parte de la proteína retenida intracelularmente (Figura 81). Nuevamente pudimos observar que GlialCAM aumentaba o favorecía los niveles de expresión en la membrana plasmática o en los contactos astrocitarios de las proteínas portadoras de mutaciones en MLC1.



**Figura 81: GlialCAM ayuda a la variante mutante P92S de *MLC1* a llegar a los procesos astrocitarios.** Se infectaron astrocitos con adenovirus que expresan la variante mutante P92S conjuntamente con GlialCAM (a MOI 2,5) y se analizaron las células por inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal contra *MLC1* (verde) y un anticuerpo monoclonal contra GlialCAM (rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Puede verse que P92S es capaz de localizarse en los procesos astrocitarios. Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Otro tipo de experimento que realizamos fueron estudios de inmunodetección en la membrana basados en luminiscencia, pero en este caso analizando la llegada de la variante P92S cuando era co-infectado con GlialCAM. Pudimos observar que P92S aumentaba sus niveles en la membrana plasmática (Figura 82) en comparación a cuando era infectado solo, sin GlialCAM (ver Figura 79 C): variaba su expresión en la membrana plasmática de un 17% a un 50% (\*\*  $p < 0,01$ , test de *T student*).

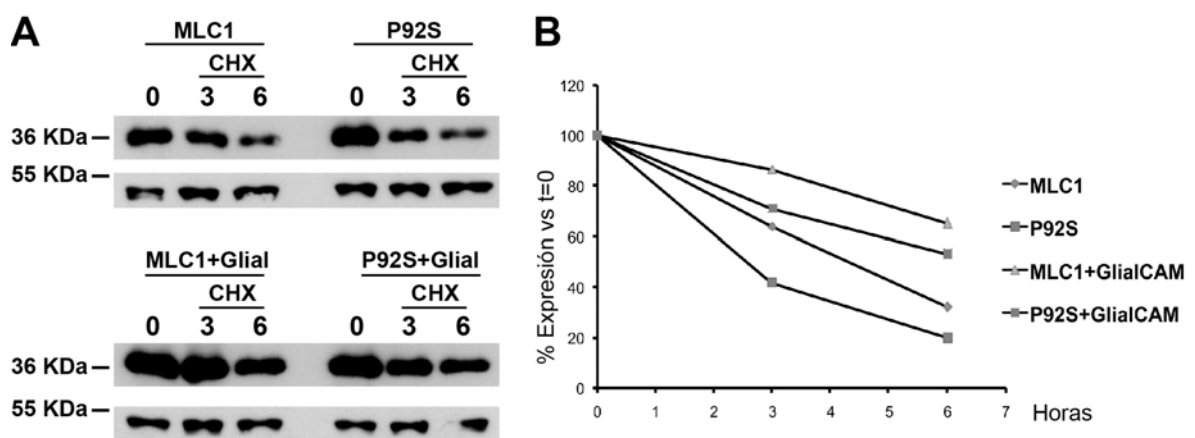


**Figura 82: GlialCAM ayuda a la variante mutante P92S de *MLC1* a aumentar sus niveles en la membrana plasmática.** Se infectaron astrocitos con adenovirus que expresan *MLC1* o P92S (ambos con un epítipo HA extracelular) y con GlialCAM (a MOI 2,5). Tras 48 horas, la expresión en superficie de *MLC1* y P92S (gracias al pítipo HA extracelular) fue cuantificada a través de experimentos de inmunodetección basados en bioluminiscencia usando un anticuerpo contra el epítipo HA extracelular. Se pudo observar que la variante P92S alcanza la membrana plasmática en torno a un 50% cuando es co-infectada con GlialCAM

respecto a como lo hace *MLC1* (N=4). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  entre MLC1+Glial y P92S+Glial. \*  $p < 0,05$  entre P92S+Glial y CTROL.

No obstante, nos percatamos de que la señal obtenida para *MLC1* cuando era co-infectada con GlialCAM era mucho menor (un 85% menos) que cuando infectábamos *MLC1* solo. Es posible que la sobreexpresión de GlialCAM afecte de alguna manera a la interacción del anticuerpo con el epítipo HA extracelular de *MLC1*. Esto es similar a lo que ocurre en el caso de las proteínas *Ostm1* y *CIC-7* (Leisle et al., 2011).

Finalmente, se llevaron a cabo experimentos para medir la estabilidad proteica de dicha variante mutante, incubando los astrocitos con cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) durante 3 y 6 horas. Esto se hizo con y sin GlialCAM, puesto que se quería analizar si la presencia de GlialCAM podía favorecer la estabilidad de la proteína mutante. Lo que se observó fue que la variante P92S presentaba una ligera menor estabilidad que MLC1 HA (Figura 83), y que GlialCAM aumentaba su estabilidad.



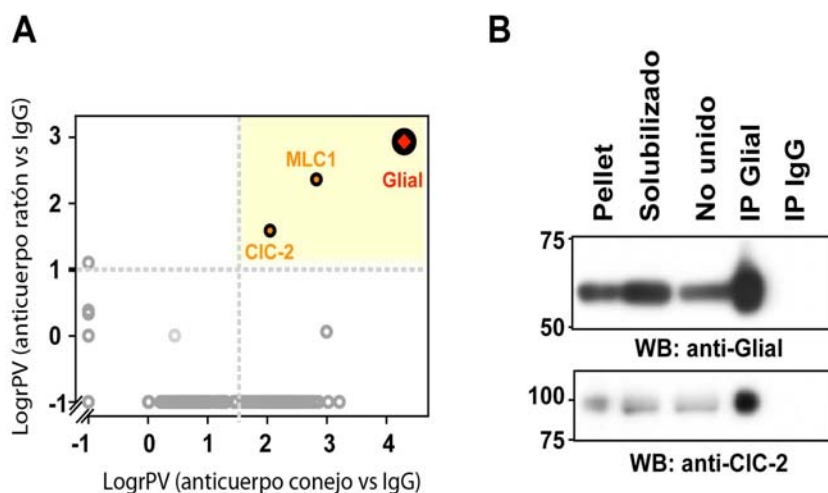
**Figura 83: Análisis de la estabilidad proteica de la variante mutante de MLC1 P92S con o sin GlialCAM en cultivo primario de astrocitos. (A)** Astrocitos infectados con adenovirus que expresaban MLC1 y la variante mutante P92S (ambos con con 2 epítomos HA), con o sin GlialCAM, (todos ellos a MOI 2,5) fueron incubados con cicloheximida (CHX, 100mg/ml) durante 3 y 6 horas. Las células fueron solubilizadas y procesadas para WB usando un anticuerpo contra MLC1 (contra el epítomo HA). El control de carga se llevó a cabo con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). **(B)** Cuantificación de las bandas usando el *software Multigauge (Fujifilm)*, y los valores se normalizaron a tiempo cero para cada uno de los grupos (MLC1, P92S, MLC1+GlialCAM, P92S+GlialCAM). Se muestra un experimento tipo. Se obtuvieron otros 2 experimentos con datos similares.

## 6. GLIALCAM Y CIC-2.

### 6.1 Introducción.

Tras el descubrimiento de GlialCAM como segundo gen de MLC gracias a la aproximación proteómica, y tras comprobar que no todo GlialCAM estaba asociado a MLC1 (gracias a los estudios de proteómica realizados por la empresa *Logopharm*, y a los resultados donde GlialCAM y no MLC1 se

encontraba en la mielina (Lopez-Hernandez et al., 2011a)), el grupo se planteó seguir la misma estrategia que había hecho anteriormente para MLC1 y decidió volver a colaborar con *Logopharm* para intentar encontrar posibles proteínas que pudiesen estar interaccionando con GlialCAM. Así, utilizando membranas de cerebros de ratón y dos anticuerpos dirigidos contra GlialCAM, (uno monoclonal hecho en ratón y comercial, y otro policlonal hecho en conejo por nuestro grupo) se hicieron experimentos de co-inmunoprecipitación y análisis de espectrometría de masas cuantitativa. Evaluando las proteínas que co-purificaban con GlialCAM se encontraron péptidos que correspondían a GlialCAM y MLC1 (como se esperaba), pero además, se encontraron péptidos que correspondían al canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2 como la otra proteína co-purificada consistentemente y específicamente en el eluido (Figura 84 A). El análisis por Western blot confirmó que CIC-2 co-purificaba con al menos una fracción de GlialCAM (Figura 84 B), lo que podía significar que bien parte del complejo se había dissociado debido al detergente, o bien que no todo GlialCAM está asociado con CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012).



**Figura 84:** Identificación de CIC-2 como una proteína asociada al interactoma de GlialCAM. (A) Evaluación de la co-purificación por afinidad de GlialCAM en cerebro de ratón. Las proteínas que co-purificaron específicamente se muestran en el cuadrado amarillo. Se usaron dos

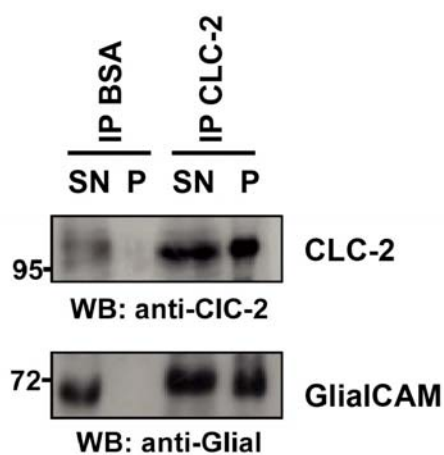
anticuerpos contra GlialCAM para hacer los experimentos. (B) Ejemplo de una purificación por afinidad usando un anticuerpo policlonal contra GlialCAM y detectándose por Western blot tanto GlialCAM (usando el mismo anticuerpo) y CIC-2 (utilizando un anticuerpo policlonal contra CIC-2).

CIC-2 pertenece a una familia génica que comprende 9 miembros (Jentsch, 2002). El primer canal voltaje-dependiente de esta familia, denominado CIC-0, fue clonado del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata*. Posteriormente, se han clonado otros 9 canales/transportadores, codificados por los genes CLCN1-7, CLCNKa y CLCNKb. Los canales CIC-0, CIC-1, CIC-2 y CIC-Ka/b se localizan en la membrana celular, mientras que los restantes miembros se encuentran en las membranas de compartimentos intracelulares.

CIC-2 puede ser activado por voltajes de membrana negativos, por un hinchamiento celular, por un aumento en la concentración de cloruro intracelular o una ligera acidificación extracelular (Grunder et al., 1992), (Thiemann et al., 1992), (Jordt and Jentsch, 1997). Su RNA mensajero se expresa en todos los tejidos (Thiemann et al., 1992), pero su presencia más abundante radica en el cerebro. El ratón *knock-out* de CIC-2 da lugar a degeneración testicular y retinal (Bosl et al., 2001), (Nehrke et al., 2002), y sorprendentemente, cuando el ratón tiene una edad más avanzada presenta una vacuolización esponjiforme de la sustancia blanca en el cerebro y en la médula espinal (Blanz et al., 2007). La mielina del SNC pero no la del SNP aparece anormal, con vacuolas llenas de fluido entre las vainas de mielina. Sin embargo, la morfología de las neuronas permanecen normales y no se observa que los ratones presenten déficits neurológicos. Un fenotipo similar vacuolizante al observado en el ratón *knock-out* de CIC-2 es el que observamos en los pacientes afectados por MLC, lo que hace que CIC-2 sea una proteína muy interesante en el contexto fisiopatológico de esta enfermedad, por lo que hemos querido repetir el mismo tipo de estudios bioquímicos realizados entre MLC1 y GlialCAM para ahora CIC-2 y GlialCAM.

## 6.2 Estudios bioquímicos para demostrar la interacción entre GlialCAM y CIC-2.

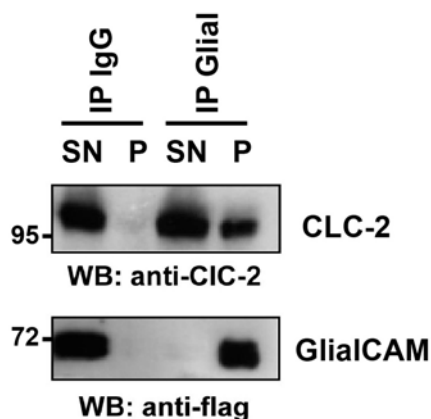
Necesitábamos confirmar que verdaderamente existía una interacción directa entre GlialCAM y CLC-2. Lo primero que se hizo fue hacer experimentos de co-inmunoprecipitación reversa, para terminar de confirmar los experimentos hechos por *Logopharm*. Se usaron cerebros de rata y se utilizó un anticuerpo contra CIC-2 (desarrollado por nuestro grupo y purificado por mi compañera de laboratorio Sònia Sirisi), el cual se fijó previamente a una columna por afinidad con tal de hacer el experimento más limpio. Se consiguió inmunoprecipitar CIC-2 y a la vez co-inmunoprecipitar GlialCAM, aunque ninguna de las dos inmunoprecipitaciones fueron completas (Figura 85).



**Figura 85: Co-inmunoprecipitación de GlialCAM usando un anticuerpo contra CIC-2.** Se homogeneizó cerebro de rata con complexiolite 47a y fue inmunoprecipitado usando bolas que tenían el anticuerpo contra CIC-2 (hecho en el laboratorio) unido. La inmunoprecipitación no fue 100% eficiente, pues no todo CIC-2 fue inmunoprecipitado, pero se detectó GlialCAM en el co-inmunoprecipitado, confirmando de manera reversa la interacción entre ambas proteínas (después de los resultados obtenidos por *Logopharm*).

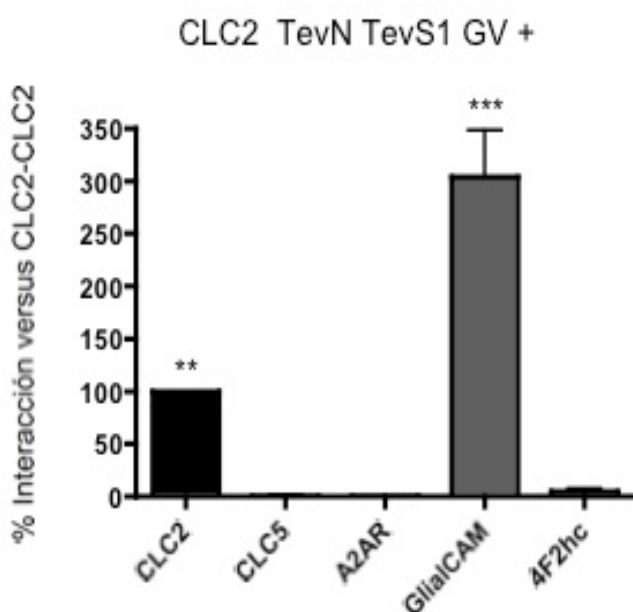
Posteriormente se llevaron a cabo experimentos similares pero esta vez en células HeLa transfectadas con CIC-2 y GlialCAM (Figura 93). Como puede observarse, se co-inmunoprecipitaba CIC-2 cuando se llevaba a cabo la inmunoprecipitación usando un anticuerpo (policlonal) contra GlialCAM, sugiriéndose una interacción directa entre ambas proteínas.





**Figura 86: Interacción directa entre GlialCAM y CIC-2.** Células HeLa transfectadas con GlialCAM (con 3 epítomos Flag) y CIC-2 (con un estopo HA) fueron solubilizadas y luego inmunoprecipitadas usando bolas con anti-GlialCAM. La inmunoprecipitación fue eficiente y específica, pues se inmunoprecipitó prácticamente el 100% de GlialCAM. CIC-2 estaba presente en el co-inmunoprecipitado de GlialCAM, confirmando la interacción directa.

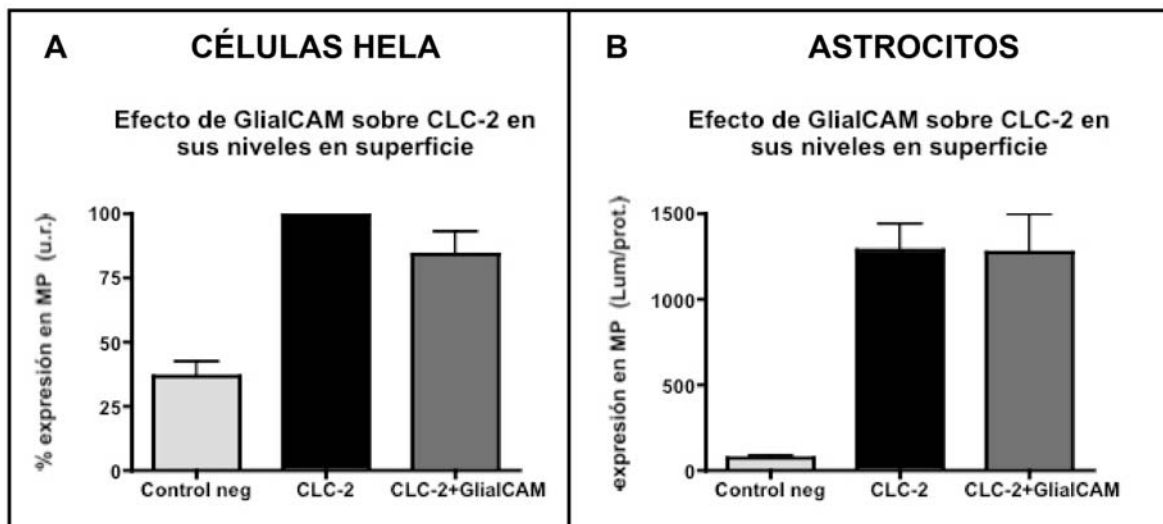
Los siguientes experimentos que se llevaron a cabo para demostrar interacción entre ambas proteínas fueron usando el ensayo de *split-TEV*. Con el resultado de estos experimentos volvía a sugerirse una interacción directa entre GlialCAM y CIC-2 (Figura 87), pues se observaba una interacción específica entre ambas proteínas y no se observaba interacción entre CIC-2 y CIC-5 (un transportador relacionado de la misma familia), entre CIC-2 y el receptor politópico 2A de adenosina, ni entre CIC-2 y la proteína de un único paso transmembrana no relacionada 4F2hc.



**Figura 87: Interacción positiva entre CIC-2 y GlialCAM por *split-TEV*.** Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción homofílica de CIC-2 + SEM. Se observa interacción significativa entre CIC-2 y GlialCAM, pero no con las proteínas no relacionadas CIC-5, A2AR y 4F2hc. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$  entre CIC-2-CIC-2 y CIC-2-4F2hc. \*\*\* $p < 0,001$  entre CIC-2-GlialCAM y CIC-2-4F2hc. Interacción CIC-2-CIC-2 N=12. Interacción CIC-2-CLC-5, N=6. Interacción CIC-2-A2AR, N=4. Interacción CIC-2-GlialCAM, N=12. Interacción CIC-2-4F2hc, N=12).



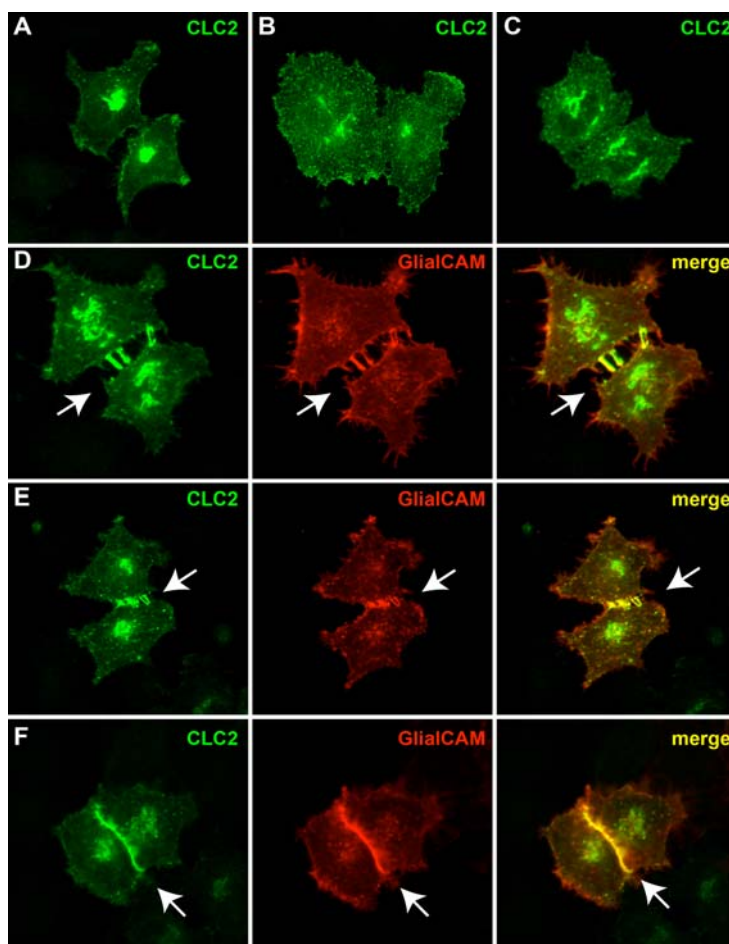
Se quiso estudiar también (como se hizo para MLC1) si la expresión de GlialCAM afectaba a los niveles de CIC-2 en superficie, en la membrana plasmática. Estos experimentos de inmunodetección basados en luminiscencia se llevaron a cabo tanto en células HeLa como en astrocitos primarios. Para ello, se construyó un adenovirus que expresara la construcción de CIC-2 con un epítipo HA extracelular (plásmido que fue proporcionado por el Dr. Pablo Cid (Centro de Estudios Científicos, Chile)). En ninguno de los dos sistemas celulares pudimos detectar que GlialCAM aumentara los niveles en superficie de CIC-2 significativamente (Figura 88).



**Figura 88: GlialCAM no modifica los niveles en superficie de CIC-2 ni en células HeLa ni en astrocitos primarios. (A)** Células HeLa fueron transfectadas con la construcción de CIC-2 con un epítipo HA extracelular y más o menos GlialCAM. **(B)** Astrocitos primarios fueron infectados con adenovirus que expresan CIC-2 con el mismo epítipo extracelular y de nuevo, más o menos GlialCAM. Tras 48 horas, la expresión en superficie de CIC-2 fue cuantificada a través de experimentos de bioluminiscencia usando un anticuerpo contra el epítipo HA extracelular. Con 4 experimentos independientes en células HeLa y 2 en astrocitos, no se observaron diferencias significativas entre CIC-2 con o sin GlialCAM en sus niveles en superficie. En **(A)** se muestra la media de los datos procedentes de las células HeLa, normalizado el 100% la expresión en superficie de CIC-2 solo, y en **(B)** un experimento tipo en astrocitos primarios.

Dado que anteriormente habíamos visto que GlialCAM funcionaba como una subunidad beta para MLC1, escoltándola hacia las uniones celulares, quisimos estudiar cómo era la asociación entre GlialCAM y CIC-2 por

inmunofluorescencia. Cuando CIC-2 era transfectado solo en células HeLa, éste era capaz de llegar a la membrana plasmática (Figura 89 A) aunque predominantemente se localizaba de manera difusa por el interior celular (Figura 89 B), concentrándose muchas veces alrededor del núcleo (Figura 89 C). Sin embargo, cuando co-transfectábamos con GlialCAM ocurría que CIC-2 era capaz de llegar a las uniones celulares, donde ambas proteínas colocalizaban (Figura 89 D-F). La localización de CIC-2 junto con GlialCAM podía observarse en procesos de contacto célula-célula largos (Figura 89 D) y cortos (Figura 89 E) (en función de la distancia entre las dos células), así como en áreas extensas de contacto entre células opuestas (Figura 89 F).



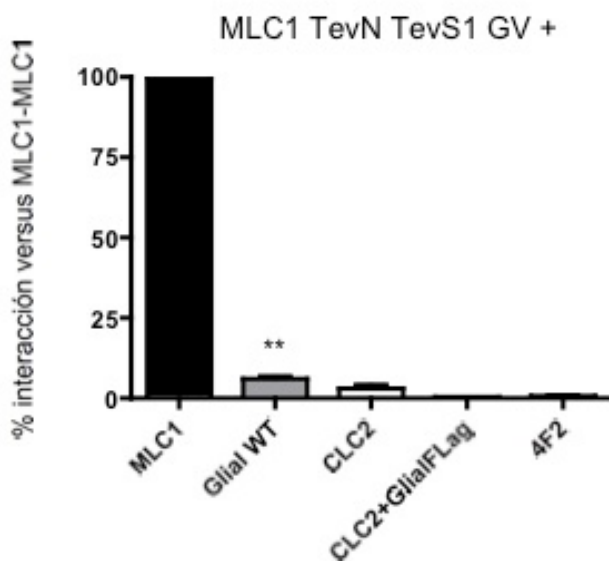
**Figura 89: GlialCAM cambia la distribución subcelular de CIC-2 en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con CIC-2 (con un epítipo HA) solo (A-C) o con GlialCAM (con 3 epítipos Flag) (D-F). La localización de CIC-2 cuando es transfectado solo puede verse en algunas células en la membrana plasmática (A), de manera difusa por el interior celular aunque también alcance la membrana (B), o bien, prácticamente en todo en el interior celular y agregado alrededor del núcleo, muy probablemente en el RE (C). Cuando es co-transfectado con GlialCAM, CIC-2 cambia su distribución hacia procesos de contacto célula-célula largos (D), cortos (E), o en zonas extensas de contacto entre células opuestas (F). En todos los casos, parte de CIC-2 sigue quedando retenido en el interior celular, muy probablemente en el RE. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias

usando un anticuerpo policlonal contra CIC-2 y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra GlialCAM). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spining disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

Después de haber demostrado la interacción entre GlialCAM y CIC-2 nos preguntamos qué papel podía tener MLC1, pues estaba claro que existía una relación directa entre MLC1 y GlialCAM y entre GlialCAM y CIC-2. Pero en los estudios de proteómica realizados por la empresa Logopharm, nunca se consiguió co-purificar CIC-2 cuando inmunoprecipitaban usando anticuerpos contra MLC1. Además, en nuestro grupo también se intentó abordar esta cuestión, e inmunoprecipitando cerebros de rata contra MLC1 nunca detectábamos CIC-2 (Duarri et al., 2011). Asimismo, cuando se deplecionaban los astrocitos de MLC1 usando RNA de interferencia, los niveles de expresión de CIC-2 se mantenían iguales (Duarri et al., 2011). También se intentaron hacer experimentos de co-inmunoprecipitación en células transfectadas con MLC1 y CIC-2, pero siempre fueron negativos. Y además, CIC-2 no resultó ser gen de enfermedad, pues se analizaron pacientes que no tenían mutaciones en *MLC1* para ver si presentaban alguna mutación en CIC-2 pero no se encontraron (Scheper et al., 2010). Aunque no observábamos una relación directa entre MLC1 y CIC-2 decidimos hacer estudios de interacción mediante ensayos de *split-Tev* en donde se testaban los tres participantes en cuestión.

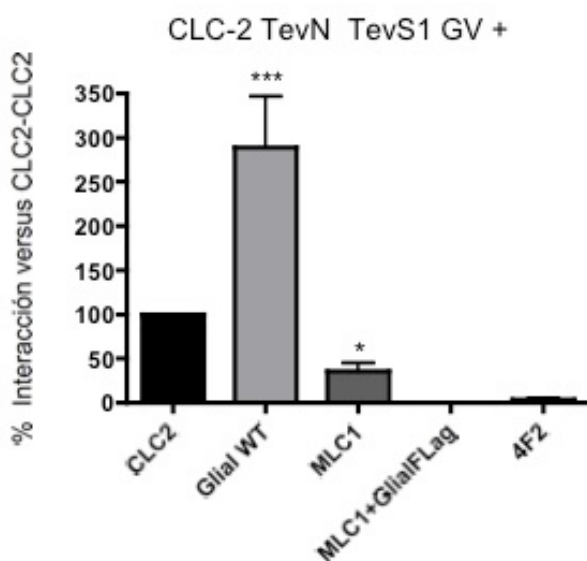
Se analizó primero la interacción entre MLC1 y CIC-2 por dicho método. El resultado fue que no encontramos diferencias significativas entre la interacción MLC1-CIC-2 y MLC1-4F2hc (considerada como control negativo de interacción) (Figura 90), por lo que en esta conformación podíamos decir que no encontramos una interacción directa entre MLC1 y CIC-2. Se procedió a añadir GlialCAM al ensayo de interacción, ya que si sabíamos que GlialCAM era capaz de llevar a las uniones a MLC1 y a CIC-2, pudiera ser que entonces

interaccionaran. Lo que pudimos observar fue que el nivel de interacción no aumentaba, que era lo que esperábamos, sino que disminuía (Figura 90).



**Figura 90: Efecto de GlialCAM sobre la interacción entre MLC1 y CIC-2 por *split-TEV*.** Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción homofílica de MLC1+SEM. Se observa interacción significativa (\*\* $p < 0,01$ ) entre MLC1 y GlialCAM (versus 4F2hc, que es el control negativo de interacción usando una T studentent), pero no con CIC-2. El añadir GlialCAM tampoco aumenta el nivel de interacción entre MLC1 y CIC-2. N=7.

Al mismo tiempo, analizamos la misma interacción pero en la otra conformación posible. Lo que observamos fue que en esta conformación sí detectábamos cierta interacción entre CIC-2 y MLC1. Sin embargo, el añadir GlialCAM no favorecía la potenciación de dicha interacción, sino todo lo contrario, como ocurría en la conformación anterior (Figura 91).

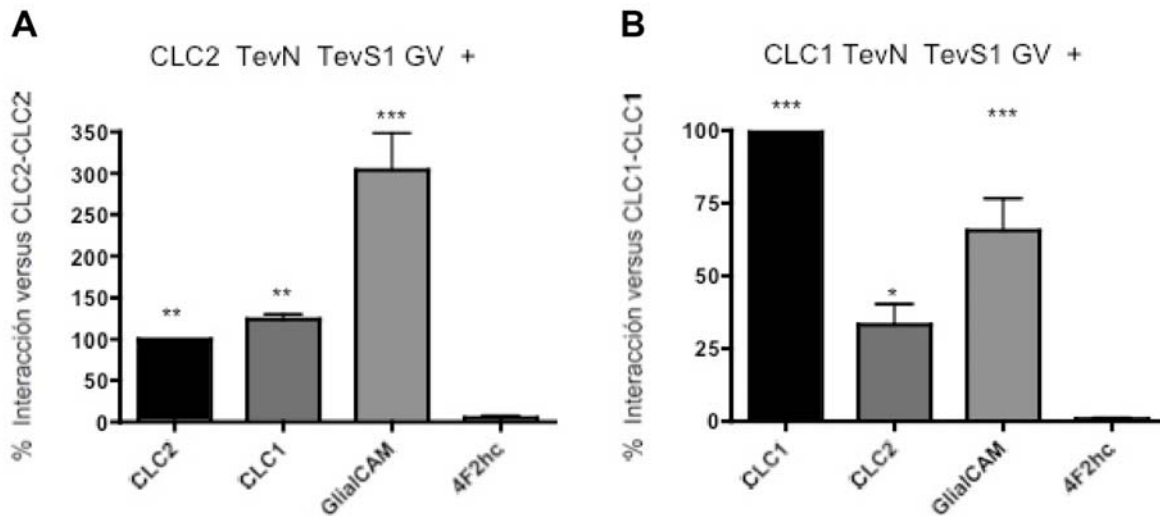


**Figura 91: Efecto de GlialCAM sobre la interacción entre CIC-2 y MLC1 por *split-TEV*.** Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción homofílica de CIC-2+SEM. Se observa interacción significativa (\*\* $p < 0,001$ ) entre CIC-2 y GlialCAM (versus 4F2hc, que es el control negativo de interacción, usando una T studentent), y también entre CIC-2 y MLC1 ((versus 4F2hc en las mismas condiciones). El añadir GlialCAM tampoco aumenta el nivel de interacción entre CIC-2 y MLC1. N=6-11.

La interpretación de los resultados tras añadir GlialCAM en el ensayo puede ser que GlialCAM estuviera compitiendo por ambas proteínas y que por eso, la señal obtenida cuando estudiábamos la interacción teniendo en cuenta las 3 proteínas era menor que cuando estudiábamos la interacción entre solamente las dos proteínas en cuestión. Por ejemplo, cuando estudiamos la interacción entre CIC-2 y MLC1, pudiera ser que al añadir GlialCAM, buena parte de MLC1 se asociara a GlialCAM, y que por eso menos MLC1 fuera capaz de interactuar con CIC-2. Y lo mismo en la otra conformación. Esta competencia demuestra la interacción de GlialCAM con MLC1 y CIC-2. Sin embargo, con todas las aproximaciones que se han llevado a cabo en el grupo para intentar encontrar una relación directa entre MLC1 y CIC-2, sólo ha sido con la técnica de *split-TEV* y en una conformación posible donde hemos podido ver interacción, por lo que tampoco podemos afirmar firmemente que haya una relación directa entre ellas, pues solo tenemos una evidencia dentro de varias aproximaciones. Tal vez esta cuestión se podrá resolver con el ratón KO de MLC1, estudiando el comportamiento de CIC-2 en dicho ratón. En el caso del ratón KO de CIC-2 no se han observado cambios en la expresión ni en la localización de MLC1 (Jeworutzki et al., 2012).

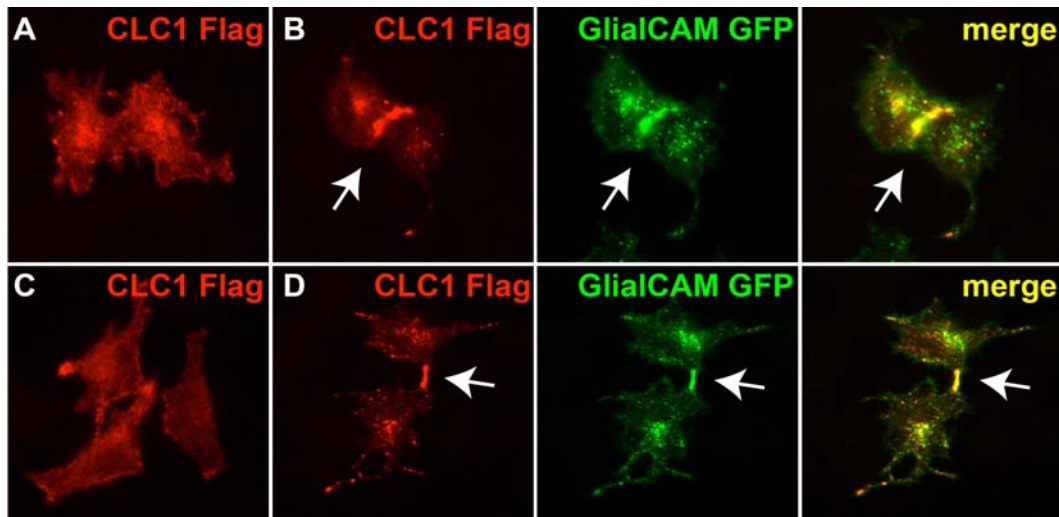
Por otro lado, quisimos estudiar si la capacidad de interacción de GlialCAM era exclusiva para el canal de cloruro CIC-2 y no para otros miembros de la familia a la que pertenecía. Decidimos entonces ensayar la interacción de GlialCAM con el canal de cloruro CIC-1. Lo primero que observamos fue que CIC-2 era capaz de interactuar con CIC-1 (Figura 92 A) y viceversa (Figura 92 B). Esta interacción *in-vitro* ya se había descrito previamente (Lorenz et al., 1996). Además, CIC-1 también era capaz de

interaccionar con GlialCAM, aunque lo hacía en menor medida a como lo hace CIC-2 (Figura 92 B).



**Figura 92: CIC-2 es capaz de interaccionar con CIC-1 y GlialCAM también lo hace con CIC-1. (A)** Interacción de CIC-2 con CIC-1 y GlialCAM por *split-TEV*. Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción hemofílica de CIC-2 + SEM. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  versus la interacción negativa CLC-2-4F2hc. (Interacción CIC-2-CIC-2 N=12 . Interacción CIC-2-CIC-1, N=7. Interacción CIC-2-GlialCAM, N=12. Interacción CLC-2-4F2hc, N=12). **(B)** Dimerización de CLC-1 e interacción de CIC-1 con CIC-2 y GlialCAM por *split-TEV*. Sobrenadantes de células HeLa transfectadas con las construcciones correspondientes fueron medidos en un luminómetro para detectar actividad luciferasa. Se representa el % de interacción respecto a la interacción hemofílica de CIC-1 + SEM. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  versus la interacción negativa CIC-1-4F2hc. N=4. Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni.

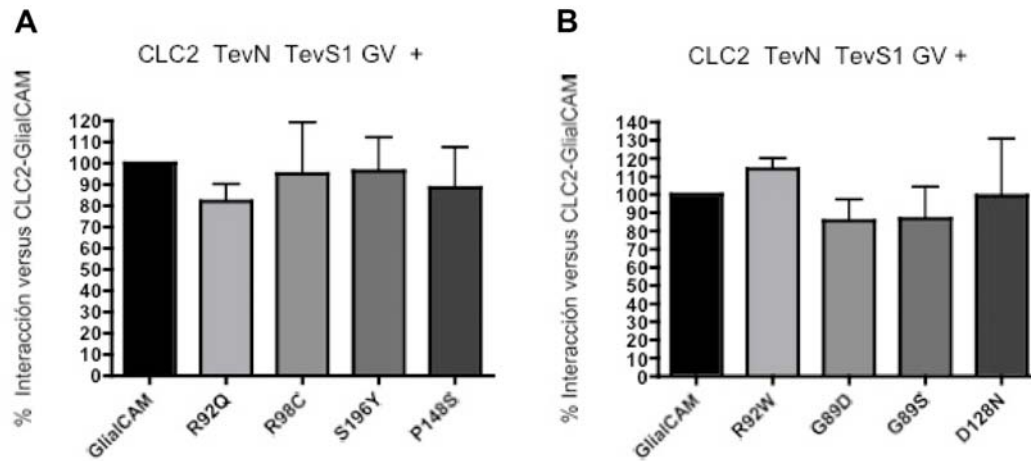
Lo sorprendente era que GlialCAM también era capaz de dirigir el tráfico de CIC-1 hacia las uniones célula-célula (Figura 93). Sin embargo, CIC-1 se localiza en el músculo esquelético (Steinmeyer et al., 1991), con lo que pensamos que esta interacción no tendría relevancia fisiológica.



**Figura 93: GlialCAM es capaz de llevar a CIC-1 a las uniones célula-célula.** (A), (C), Distribución celular de CIC-1 en células HeLa cuando es transfectado solo. Puede verse que estando dos células en contacto, su localización es mayoritariamente difusa por el interior celular aunque llega un poco a la membrana plasmática. En ningún caso, se observa señal en la unión ni en procesos de contacto entre las células vecinas. (B) GlialCAM cambia la localización de CIC-1 a uniones celulares de manera similar a como lo hace con CIC-2. Se observa CIC-1 en zonas extensas de contacto entre células opuestas. (D) Cuando CIC-1 es co-transfectado con GlialCAM, CIC-1 cambia su distribución hacia procesos de contacto célula-célula largos, si las células están separadas. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra CIC-1). GlialCAM (en verde) fue visualizado por el filtro de GFP, ya que portaba la esmeralda GFP fusionada en el extremo C terminal. La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spining disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

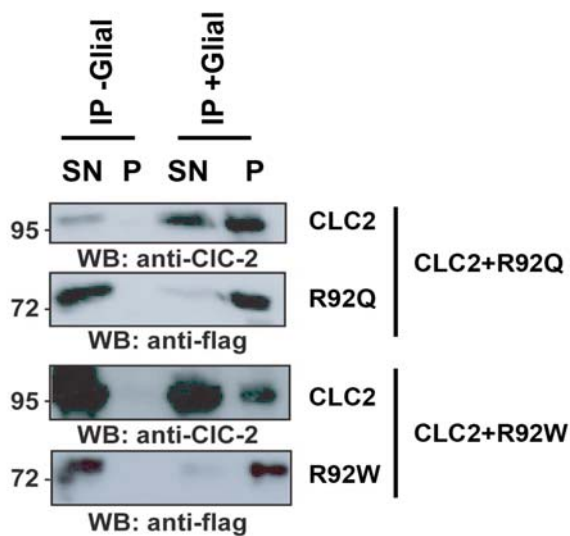
### 6.3 Estudio de las mutaciones de *GLIALCAM* encontradas en pacientes de MLC en células HeLa.

El siguiente paso que hicimos fue estudiar cómo afectaban las mutaciones descritas en *GLIALCAM* sobre CIC-2. Lo hicimos mediante estudios de interacción por *split-TEV*, por experimentos de co-inmunoprecipitación y por ensayos de inmunofluorescencia. En primer lugar, pudimos observar que tanto las variantes que portaban mutaciones recesivas como dominantes en *GLIALCAM* no afectaban a la interacción con CIC-2 (Figura 94).



**Figura 94: Mutaciones en *GLIALCAM* causantes de MLC no afectan a la hetero-interacción con *CIC-2*.** Células HeLa fueron co-transfectadas con las construcciones correspondientes y la interacción fue monitorizada por el ensayo de *split-TEV*. La señal obtenida para la hetero-interacción entre *CLC-2* y *GlialCAM* salvaje fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción de las variantes recesivas (A) y de las variantes dominantes (B) comparado con la interacción de la proteína salvaje + SEM. No se observaron diferencias significativas. (N=5 para variantes recesivas; N=4 para variantes dominantes).

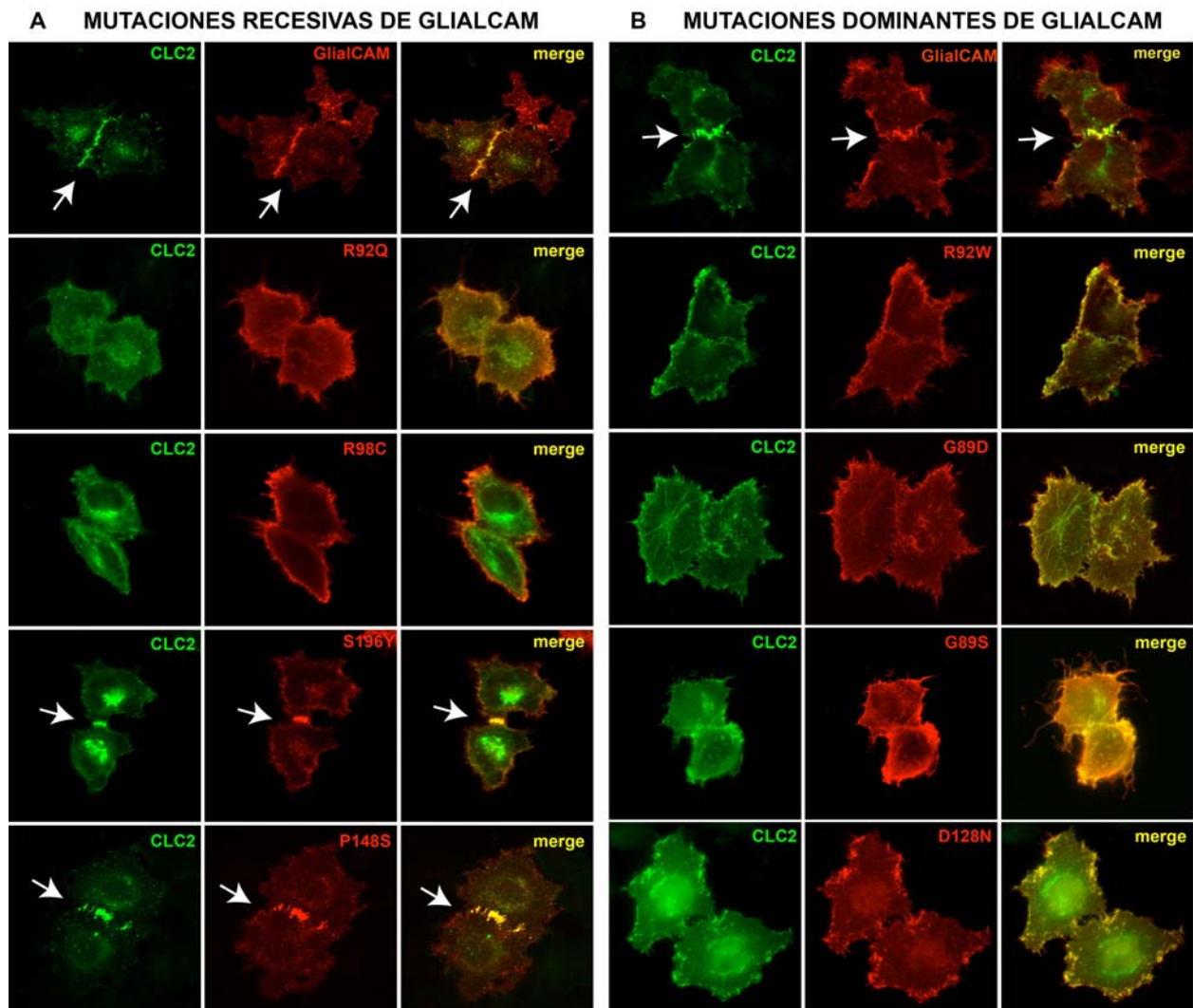
Viendo esto, estudiamos dos variantes por co-inmunoprecipitación. Elegimos dos que tenían afectado el mismo residuo, y una era recesiva y la otra dominante. En ambos casos se detectó *CIC-2* cuando se inmunoprecipitaba usando un anticuerpo contra *GlialCAM*. Por tanto, la interacción entre *CIC-2* y dichas variantes no se veía afectada (Figura 95).



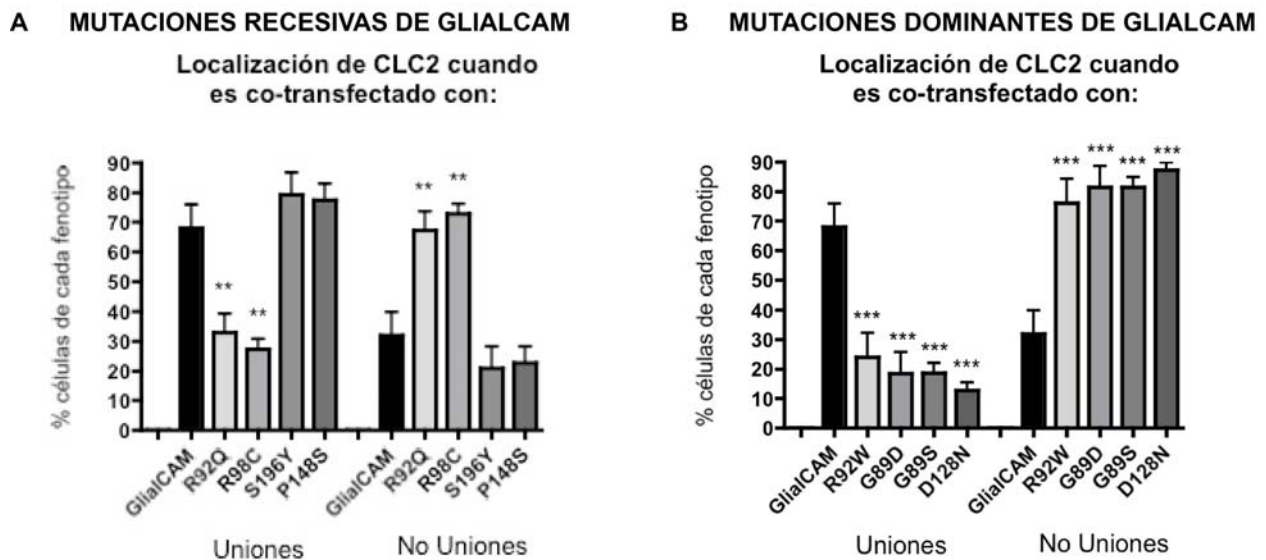
**Figura 95: Las variantes proteicas portadoras de dos mutaciones en *GLIALCAM* interaccionan bioquímicamente con *CIC-2*.** Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando extractos de células HeLa transfectadas con *CIC-2* (con un epítipo HA) y con las variantes proteicas indicadas que contenían la mutación recesiva R92Q y la dominante R92W. En ambos casos, se detectó *CIC-2* en el co-inmunoprecipitado. Resultados similares se han visto en dos experimentos independientes.



No obstante, cuando estudiamos como afectaban dichas variantes al tráfico de CIC-2 por inmunofluorescencia, pudimos observar que la mayor parte de ellas hacían que CIC-2 llegara mucho menos a las uniones celulares en comparación a como lo hacía con la proteína GlialCAM salvaje (Figuras 96 y 97).



**Figura 96: CIC-2 sigue la localización de las variantes de GlialCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con CIC-2 y con GlialCAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan las mutaciones indicadas. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra CIC-2 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra GlialCAM (en rojo). La colocación entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. No se vio defecto en el tráfico para las variantes S196Y y P148S, las cuales hacían que CIC-2 siguiera concentrándose en las uniones celulares de la misma manera que lo hacía la proteína salvaje.

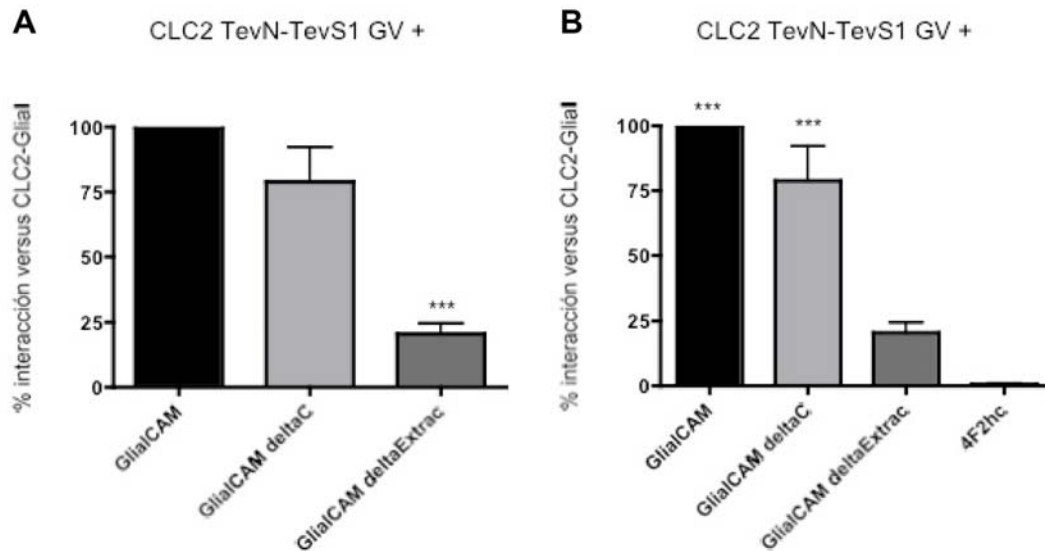


**Figura 97: Cuantificación del efecto de las variantes de GlialCAM sobre la localización de CIC-2.** Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o no en uniones (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa *ImageJ* para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 4-10 experimentos independientes. CIC-2 (+GlialCAM) fue detectado en un 68 + 8,3% en uniones versus un 31,9 + 8,3% no en uniones (273 células, N=8); CIC-2 (+R92Q) fue detectado en un 32,8%+7,7 en uniones versus a un 67,1+12,5% en no uniones (369 células, N=10); CIC-2 (+R98C) fue detectado en un 27,2+3,7% en uniones versus a un 72,7+3,7% en no uniones (281 células, N=8); CIC-2 (+S196Y) fue detectado en un 79,2+7,9% en uniones versus a un 20,7% en no uniones (185 células, N=8); CIC-2 (+P148S) fue detectado en un 77,3+5,9% en uniones versus a un 22,6+5,9% en no uniones (222 células, N=10); CIC-2 (+R92W) fue detectado en un 23,9+8,9% en uniones versus a un 76+8,9% en no uniones (220 células, N=7); CIC-2 (+G89D) fue detectado en un 18,5+7,9% en uniones versus a un 81,5+7,9% en no uniones (185 células, N=6); CIC-2 (+G89S) fue detectado en un 18,5+3,7% en uniones versus a un 81,4+3,7% en no uniones (226 células, N=7); CIC-2 (+D128N) fue detectado en un 12,7+2,8% en uniones versus a un 87,2+2,8% en no uniones (185 células, N=6). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni comparando la localización de CLC-2 cuando era co-transfectado con la proteína GlialCAM salvaje frente a cuando lo era con las variantes mutadas. \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001. No se vio este defecto en el tráfico para las variantes S196Y y P148S, las cuales hacían que CIC-2 siguiera concentrándose en las uniones celulares de la misma manera que lo hacía la proteína salvaje.

### 6.3 Análisis de dos formas de GlialCAM delecionadas para intentar encontrar dominios de interacción entre moléculas de GlialCAM y CIC-2.

Al igual que se hizo para MLC1, quisimos estudiar cómo afectaban a la interacción con CIC-2 así como al tráfico de éste en células HeLA transfectadas las variantes de GlialCAM delecionadas de su cola citoplasmática y del dominio extracelular. En los ensayos por *split-TEV* pudimos ver que la interacción con CIC-2 se veía reducida en el caso de la variante donde se había eliminado el

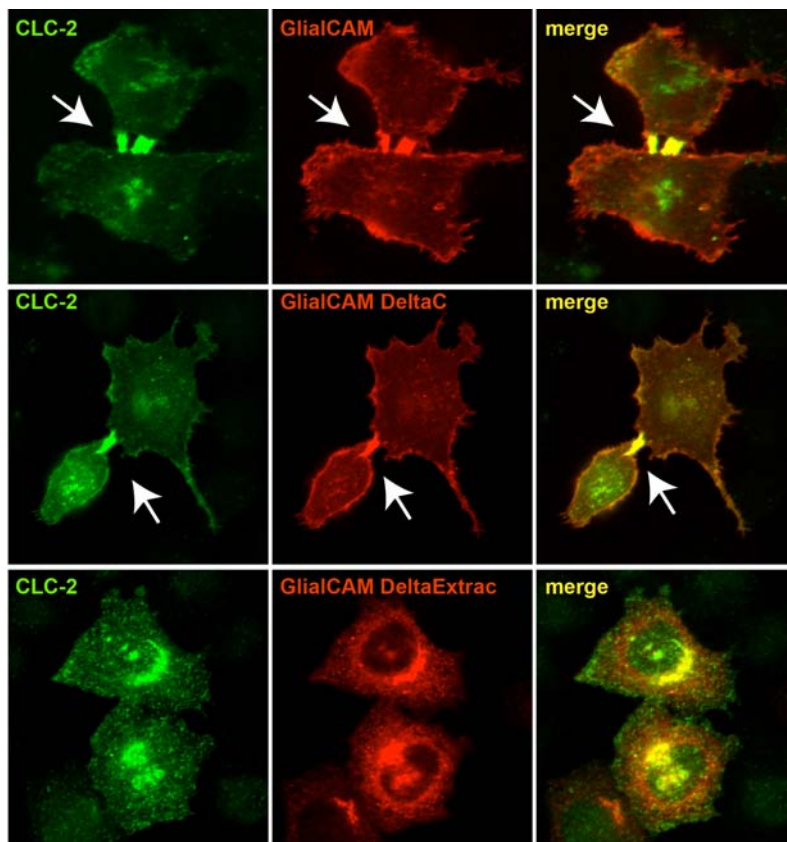
dominio extracelular (Figura 98). En cambio, la variante que no poseía el dominio citoplasmático seguía interaccionando con CIC-2 prácticamente igual que lo hacía la proteína GlialCAM salvaje.



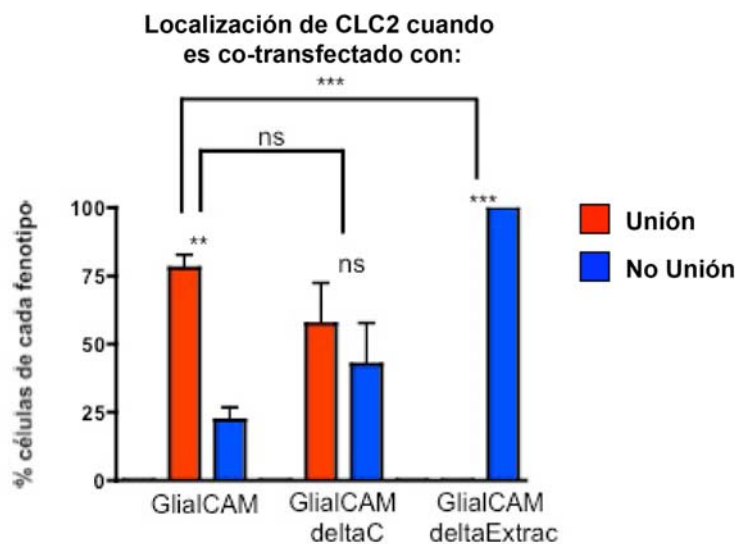
**Figura 98: Efecto del dominio citoplasmático y extracelular de GlialCAM en la interacción con CIC-2.** Células HeLA fueron co-transfectadas con las construcciones correspondientes y la interacción fue monitorizada por el ensayo de split-TEV. La señal obtenida para la hetero-interacción entre CIC-2 y GlialCAM salvaje fue representado como el 100% de interacción. Se indica el % de interacción de las 2 variantes quiméricas comparado con la interacción de la proteína salvaje + SEM. **(A)** Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni. (\*\* $P < 0,001$  entre la interacción GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-GlialCAM deltaExtracelular,  $N=10$ ). No hay diferencias significativas entre la interacción GlialCAM-GlialCAM y GlialCAM-GlialCAM deltaC,  $N=10$ . **(B)** Se utilizó el test de comparación múltiple de Bonferroni, esta vez comparando contra la interacción negativa CLC-2-4F2hc. Se observa lo mismo que en (A). Tanto la interacción CIC-2-GlialCAM salvaje y CIC-2-GlialCAM deltaC presentan interacción positiva versus la interacción negativa CLC-2-4F2hc (\*\* $p < 0,001$ ,  $N=10$ ). En cambio, no hay diferencias significativas entre la interacción CLC-2-GlialCAMdeltaExtrac y CIC-2-4F2hc ( $N=10$ ), pudiendo considerarse que dicha variante quimérica no interacciona con CIC-2.

Cuando estudiamos estas variantes junto con CIC-2 por inmunofluorescencia, observamos lo mismo que ya habíamos visto mediante los ensayos de interacción por *split-TEV*. CIC-2 solamente dejaba de concentrarse en las uniones celulares cuando era co-transfectado con la variante de GlialCAM que tenía el dominio extracelular delecionado. De hecho, en este caso, tras el análisis de pares de células, CIC-2 nunca se concentró en uniones. En cambio, cuando CIC-2 fue co-transfectado con la variante que no poseía la cola citoplasmática, CIC-2 era capaz de alcanzar las uniones célula-

célula de igual manera que lo hacía con la proteína salvaje, sugiriendo que el dominio citoplasmático no era indispensable para su interacción (Figura 99).



**Figura 99: CIC-2 no se concentra en las uniones celulares cuando es co-transfectado con las variante de Gli3CAM que tiene deletado el dominio extracelular.** Células HeLa fueron transfectadas con CIC-2 y con Gli3CAM salvaje o con los plásmidos correspondientes que portan la deleción del dominio citoplasmático (Gli3CAM deltaC) o la deleción del dominio extracelular (Gli3CAM deltaExtrac). Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra MLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra Gli3CAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spining disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si CIC-2 se concentraba en uniones o no (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media de 3-4 experimentos independientes + SEM.

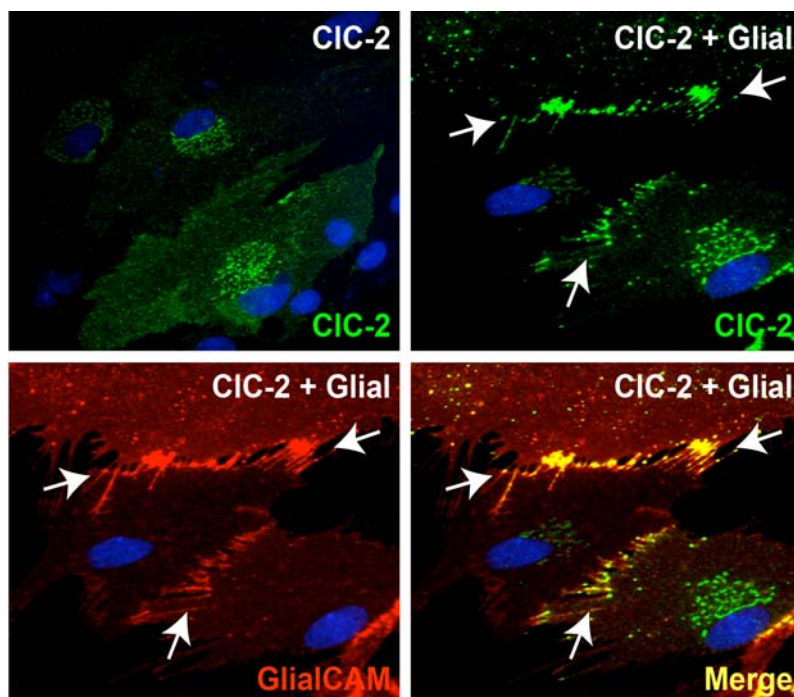


(CIC-2+Gli3CAM: 122 células, N=4. CIC-2+Gli3CAM deltaC: 74 células, N=3. CIC-2+Gli3CAM deltaExtrac: 77 células, N=3). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni y se obtuvieron diferentes significaciones. Entre la localización de CIC-2 cuando es co-transfectado con Gli3CAM salvaje en uniones y no uniones: \*\*p<0,01. Entre la localización de CIC-2 cuando es co-transfectado con Gli3CAM deltaC en uniones y no uniones: no significativo (ns). Entre la localización de CLC-2 cuando es co-transfectado con Gli3CAM deltaExtrac en uniones y no uniones: \*\*\*p<0,001. Si comparamos cómo varía la localización de CIC-2 cuando es co-transfectado con Gli3CAM salvaje o con alguna de las variantes quiméricas, sólo se observa un cambio significativo en el caso de Gli3CAM deltaExtrac (\*\*p<0,001).



### 6.3 Estudios de las mutaciones de *GLIALCAM* encontradas en pacientes de MLC en cultivos primarios de astrocitos.

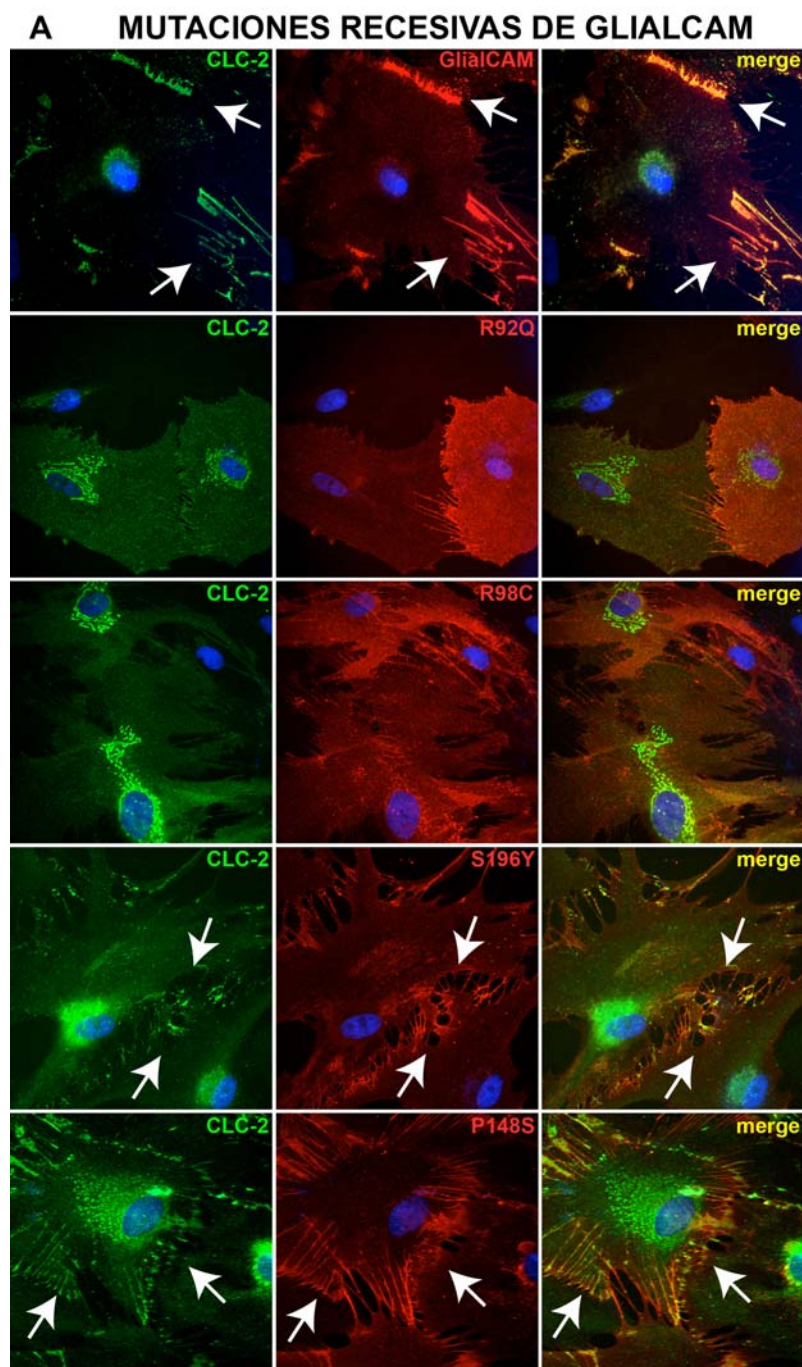
Tras todos los estudios realizados en células HeLa, quisimos estudiar qué era lo que pasaba entre estas dos proteínas pero ahora en cultivo primario de astrocitos. En este modelo, se volvió a demostrar la interacción directa que existía entre CIC-2 y GlialCAM, porque cuando se infectaban astrocitos solo con CIC-2, éste se localizaba mayoritariamente en el interior celular, sobre todo agregado alrededor del núcleo, muy posiblemente en el RE. Sin embargo, cuando co-infectábamos los astrocitos tanto con CIC-2 como con GlialCAM, CIC-2 era capaz de localizarse en las uniones astrocitarias, aunque aún seguía habiendo parte de la proteína que también quedaba retenida (Figura 100).

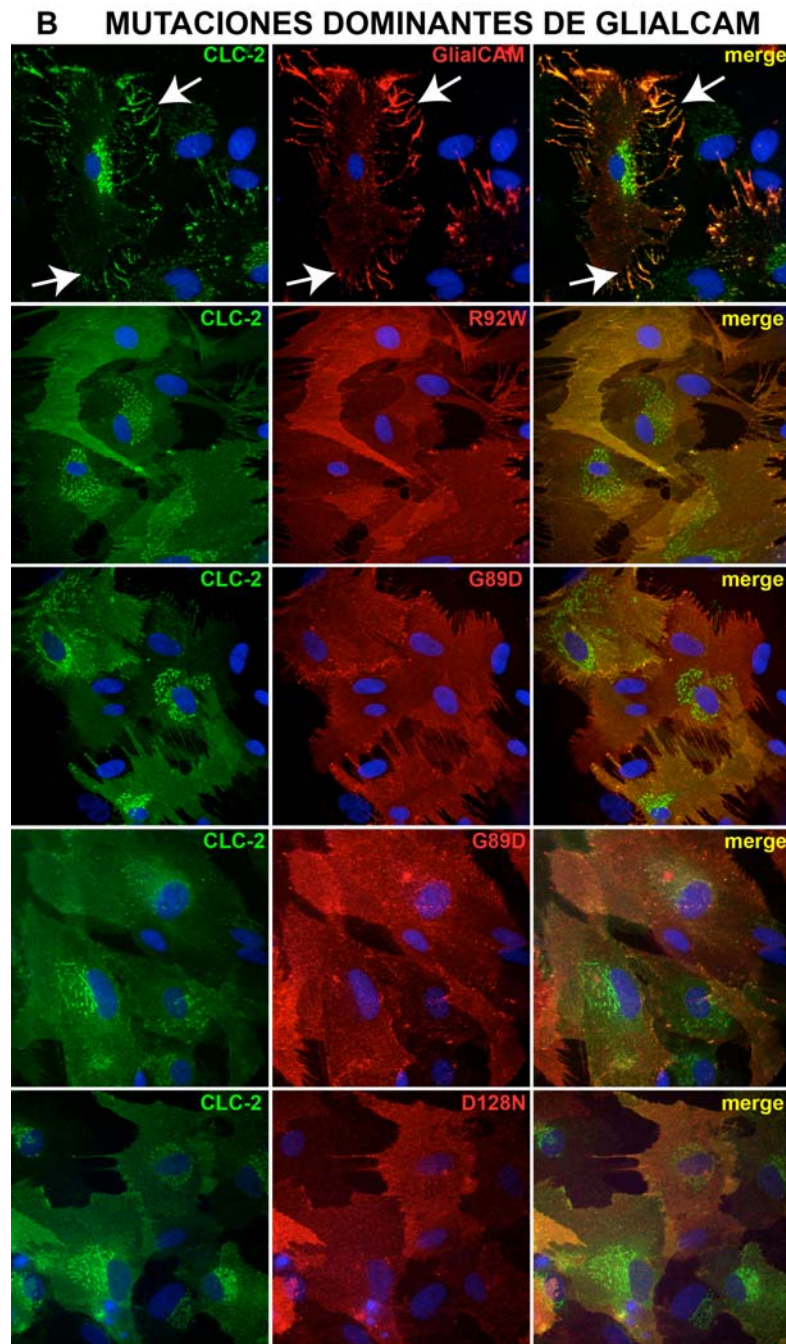


**Figura 100: GlialCAM cambia la distribución subcelular de CIC-2 también en astrocitos primarios.** Astrocitos fueron infectados con adenovirus que expresaban CIC-2 más o menos adenovirus que expresaban GlialCAM a MOI 2,5. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra CIC-2 y un anticuerpo monoclonal contra GlialCAM. La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas

indican los contactos célula-célula. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 5 experimentos independientes. La localización de CIC-2 es tinctado solo puede verse en el interior celular, sobre todo alrededor del núcleo. Cuando es co-infectado con GlialCAM, CIC-2 cambia su distribución y es capaz de dirigirse hacia procesos de contacto astrocito. Aún así, parte de CIC-2 sigue quedando retenida en el interior celular, muy probablemente en el RE.

Estudiamos por tanto, cómo afectaban las variantes mutadas de *GLIALCAM* a la localización de CIC-2 en los astrocitos primarios. Lo que observamos fue que en casi todos los casos, CIC-2 volvía a quedar retenido y no era capaz de concentrarse en las uniones entre astrocitos como ocurría cuando era co-infectado con GlialCAM salvaje (Figura 101). Volvíamos a no observar defecto para los casos de las variantes S196Y y P148S, donde CIC-2 sí era capaz de alcanzar los procesos astrocitarios.





**Figura 101: CIC-2 ve alterado su tráfico cuando es co-infectado con las variantes mutantes de *GLIALCAM* en cultivo primario de astrocitos.** Se infectaron astrocitos con adenovirus que expresan CIC-2 más GlialCAM salvaje; o GlialCAM que contiene las mutaciones recesivas R92Q, R98C, S196Y y P148S (**A**); o las mutaciones dominantes R92W, G89D, G89S y D128N (**B**) a MOI 3. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra CIC-2 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra GlialCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. Cuando CIC-2 es co-infectado con variantes mutadas, CIC-2 se localiza principalmente de manera difusa en el interior celular y en agregados alrededor del núcleo, muy probablemente en el RE o Aparato de Golgi, salvo en el caso de las variantes S196Y y P148S, que sí es capaz de concentrarse en las uniones (aunque también hay parte de CIC-2 retenida). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 3-4 experimentos independientes.



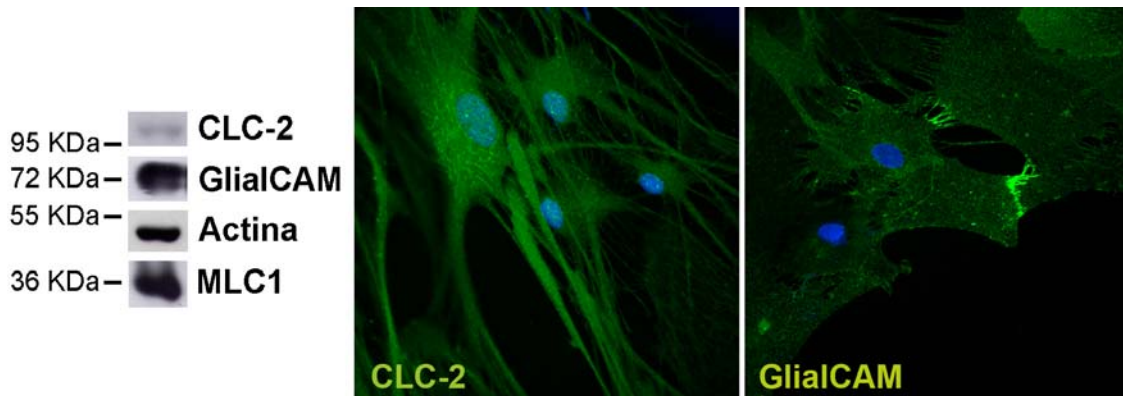
### 6.6 Relación fisiológica entre GlialCAM y CIC-2.

Paralelamente al trabajo que hemos realizado, hemos llevado a cabo una colaboración con el grupo italiano dirigido por el Dr. Michael Pusch (Instituto de Biofísica en Génova, Italia), en la cual se han llevado a término estudios electrofisiológicos de la interacción GlialCAM-CIC-2. Dichos estudios indican que GlialCAM incrementa las corrientes mediadas por CIC-2 (tanto en oocitos de *Xenopus* como en células HEK transfectadas). Asimismo, GlialCAM cambia sus propiedades funcionales, incrementando dramáticamente las corrientes mediadas por CIC-2, cambiando sus propiedades de activación y su rectificación, permitiendo más flujo de cloruro a voltajes positivos (Jeworutzki et al., 2012). Esto ha demostrado una interacción funcional entre estas dos proteínas. Es por ello que nosotros quisimos estudiar si GlialCAM alteraba las corrientes de CIC-2 nativas en un modelo más cercano al real, en astrocitos primarios de rata. Para ello contamos con la colaboración del Dr. Xavier Gasull, profesor titular de la Universidad de Barcelona, para hacer registros electrofisiológicos mediante la técnica de *Patch-Clamp*.

Para llevar a cabo dichos registros, los astrocitos debían ser tratados con diBAMPc (en vez de con AraC, que era cómo lo hacíamos normalmente). Esto es así porque los astrocitos que crecen en cultivo son células poligonales algo aplastadas, y por tanto, cuesta más registrarlos. En cambio, cuando estas células son tratadas con diBAMPc, su morfología cambia, transformándose en células más estrelladas donde el cuerpo celular no queda tan aplastado, pudiendo ser registrados. Además, ya se sabía que en estas condiciones los astrocitos expresaban el canal de cloruro CIC-2 (Ferroni et al., 1997).



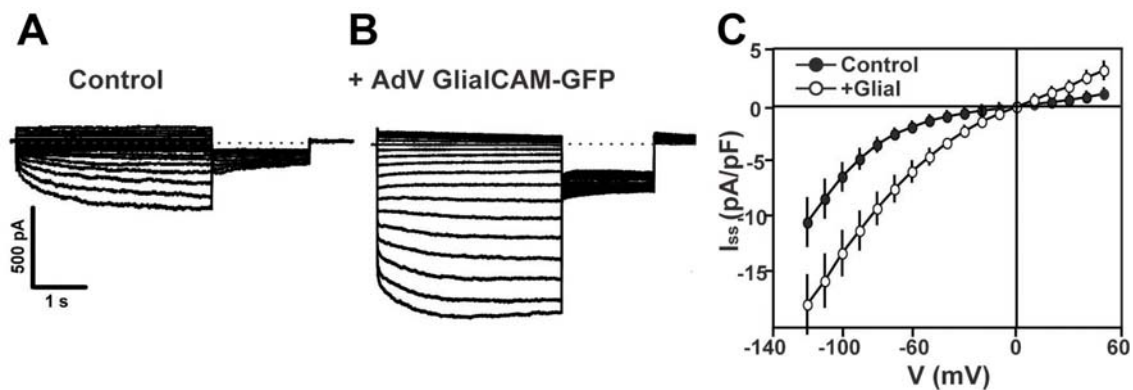
Antes de proceder a realizar los registros electrofisiológicos, quisimos verificar que los astrocitos con diBAMPc expresaban tanto CIC-2 como GlialCAM endógenamente. Pudimos comprobar que ambas proteínas eran expresadas (Figura 102).



**Figura 102: El tratamiento de los astrocitos de rata con diBAMPc no afecta a la expresión de CIC-2 ni de GlialCAM.** **Izquierda,** Astrocitos tratados con diBAMPc durante 2 semanas fueron procesados por WB. Se detecta expresión de CIC-2 así como de GlialCAM. **Derecha,** Astrocitos tratados con diBAMPc durante 2 semanas fueron fijados y permeabilizados y se realizaron inmunofluorescencias usando anticuerpos policlonales contra CIC-2 y GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Puede detectarse a GlialCAM en uniones entre astrocitos, y CIC-2 de manera difusa en el citoplasma astrocitario y alrededor del núcleo, seguramente en el RE (aunque el anticuerpo usado no es muy bueno para inmunocitoquímica).

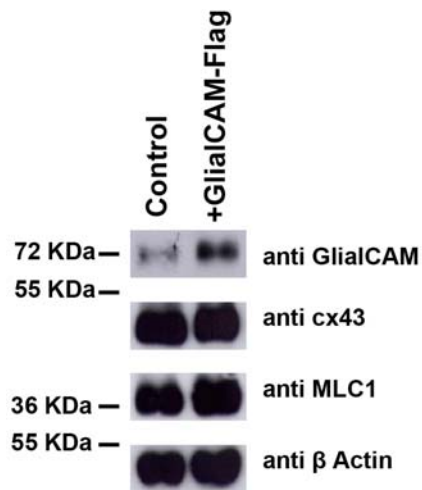
El siguiente paso fue registrar astrocitos control con el fin de obtener las corrientes de cloruro típicas mediadas por CIC-2. Pudimos ver que nuestros astrocitos de rata presentaban dichas corrientes, con el perfil de activación retardado (Figura 103 A), como se veía en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus* y células HEK transfectadas (Jeworutzki et al., 2012)). Estas corrientes eran bloqueadas por yodo, demostrando de esta manera que eran mediadas por CIC-2 (Ferroni et al., 1997), (Makara et al., 2003), ya que se sabe que el yodo es capaz de bloquear específicamente dichas corrientes (Thiemann et al., 1992). Después se procedió a transducir los astrocitos con adenovirus que expresaban GlialCAM fusionado a GFP. De esta manera se

podían seleccionar las células verdes que expresaban GlialCAM. En estas células, se observaba un cambio en el comportamiento de las corrientes de cloruro mediadas por CIC-2 (Figura 103 B). Las corrientes habían incrementado y mostraban menos rectificación así como un componente instantáneo mayor, es decir, eran mucho más rápidas y no mostraban el efecto retardado de activación típico de las corrientes de CIC-2 (Figura 103 C). El efecto observado era cualitativamente similar al observado en los sistemas heterólogos (Jeworutzki et al., 2012). Estas corrientes también eran bloqueadas por yodo, por lo que el efecto que observávamos estaba mediado por GlialCAM.



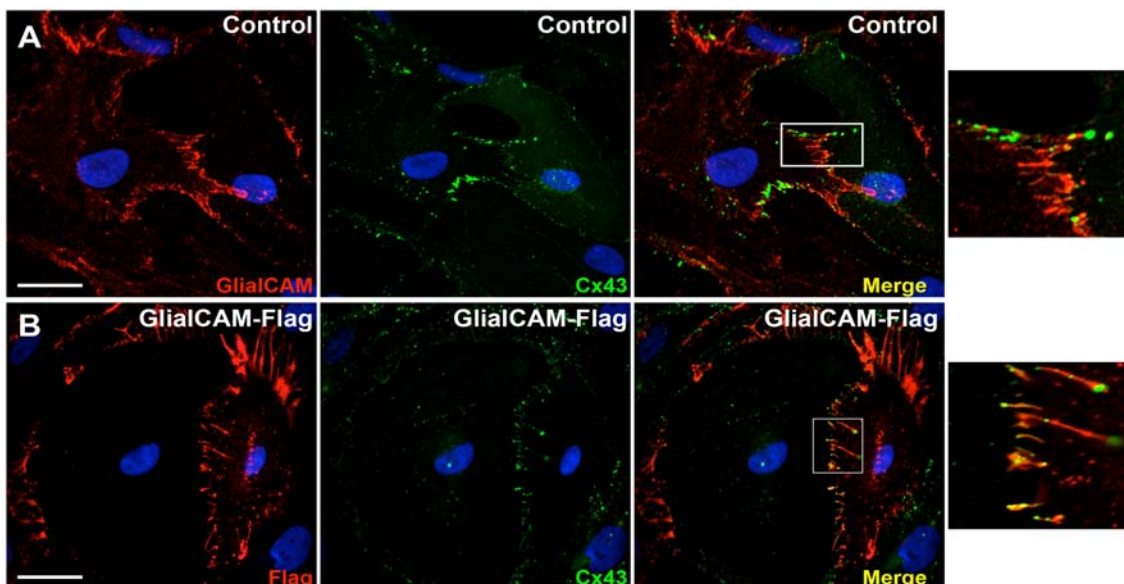
**Figura 103: GlialCAM modifica las corrientes mediadas por CIC-2 en astrocitos primarios de rata.** (A) Traza representativa de corrientes de  $\text{Cl}^-$  *whole-cell inwardly rectifying* en astrocitos de rata tratados con diBAMPC. Estas corrientes eran bloqueadas por yodo. (B) Traza representativa de las corrientes de cloruro mediadas por astrocitos tratados con diBAMPC tras ser transducidos con adenovirus que expresan GlialCAM fusionada a GFP. (C) Gráfica de la relación *average steady-state current-voltage* de astrocitos tratados con diBAMPC control (círculos negros) o transducidos con GlialCAM-GFP (círculos blancos).  $n=8$  para control y  $n=6$  para GlialCAM-GFP.

El hecho que GlialCAM aumentara tan drásticamente las corrientes mediadas por CIC-2 hacía hipotetizar que la expresión de GlialCAM pudiera incrementar las corrientes a consecuencia de estimular corrientes a través de uniones *gap*. Sin embargo, la sobreexpresión de GlialCAM no modificaba los niveles de expresión de la conexina 43, la conexina más abundante en los astrocitos (Figura 104).



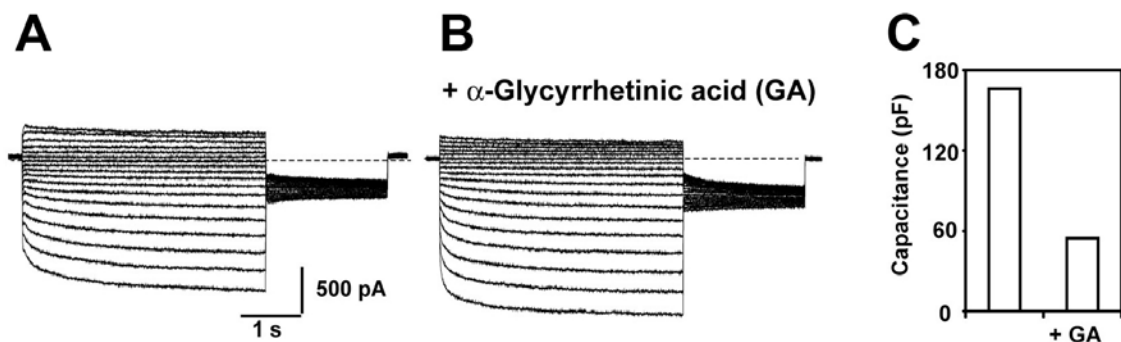
**Figura 104:** La sobreexpresión de GlialCAM en astrocitos primarios de rata no modifica los niveles de expresión de la conexina 43 (cx43), la conexina mayoritaria astrocitaria. Astrocitos primarios de rata eran diferenciados durante 3 semanas con AraC. Entoces fueron infectados con el adenovirus que expresa la construcción GlialCAM-Flag. Tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB. Se observa un nivel similar de expresión de cx43 (y MLC1) tanto en los astrocitos control como en los astrocitos infectados con GlialCAM. Control de carga realizado con anti  $\beta$  Actina. N=3

Asimismo, quiso estudiarse si la sobreexpresión de GlialCAM modificaba la localización de dicha conexina 43 (Figura 105 A). Al igual que en el caso de MLC1 (Duarri et al., 2011), GlialCAM y Cx43 co-localizaban parcialmente. Cuando se sobreexpresaba GlialCAM mediante la transducción con adenovirus podía verse que la localización de Cx43 no se veía modificada (Figura 105 B).



**Figura 105:** La sobreexpresión de GlialCAM en astrocitos de rata no modifica la localización de la Cx43. **(A)** Inmunolocalización en astrocitos primarios de rata diferenciados 3 semanas con AraC de las proteínas endógenas GlialCAM (anticuerpo policlonal, en rojo), y cx43 (anticuerpo monoclonal contra cx43, en verde). La co-localización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Se adjunta una inserción de una magnificación de los procesos astrocitarios, donde se observa que GlialCAM no co-localiza totalmente con cx43. **(B)** La sobreexpresión de GlialCAM-Flag mediada por adenovirus no modifica la localización subcelular de la cx43. Tras 48 horas de la infección, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias con un anticuerpo contra el epítipo Flag (contra GlialCAM) y con un anticuerpo policlonal contra cx43. La co-localización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Además de todo esto, se probó a intentar bloquear las uniones tipo *gap* con el inhibidor *glycyrrhetic acid* (GA) en astrocitos acoplados. Lo que se pudo ver es que el inhibidor funcionaba, ya que era capaz de disminuir la capacitancia de la membrana celular registrada, pero no modificaba las corrientes inducidas por GlialCAM (Figura 106). Estos resultados, junto con aquellos donde las corrientes eran bloqueadas por yodo nos indicaban que las corrientes observadas estaban mediadas por CIC-2/GlialCAM; y las conexinas no parecían estar implicadas.



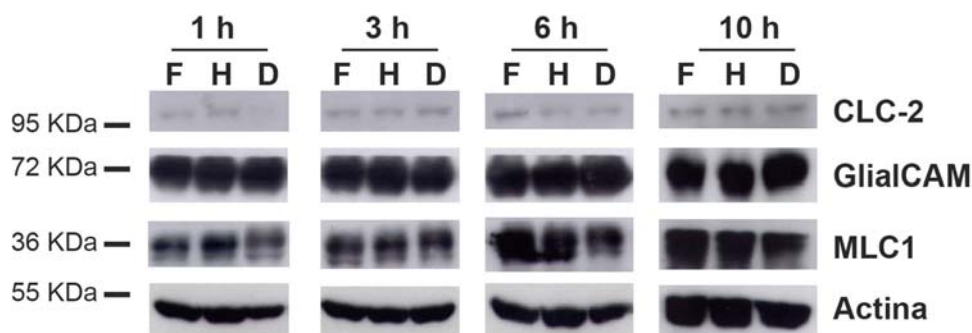
**Figura 106:** Las corrientes de  $\text{Cl}^-$  mediadas por CIC-2/GlialCAM no se ven afectadas tras el tratamiento con un inhibidor de las uniones tipo *gap* *glycyrrhetic acid* (GA). (A) Trazas representativas de las corrientes de cloruro de astrocitos de rata tratados con diBAMPc, transducidos con adenovirus que expresan GlialCAM-GFP. Gracias a la GFP se puede observar que el astrocito registrado está acoplado con un astrocito vecino, antes (A) y después (B) de la aplicación de 25  $\mu\text{M}$  de GA. (C) Se muestra la capacitancia de la membrana registrada antes y después de la aplicación de GA para esta célula. N=4.

A pesar de la demostración de la interacción bioquímica y funcional entre GlialCAM y CIC-2, seguíamos sin entender el por qué nunca se había registrado *in vivo* la corriente mediada por CIC-2 con el perfil de corriente que nosotros observábamos con el complejo CIC-2/GlialCAM, y cuál era la relevancia fisiológica para esta interacción así como el papel de CIC-2 en las uniones astrocitarias.

Ya que solamente habíamos podido ver a CIC-2 en las uniones astrocitarias cuando sobreexpresábamos GlialCAM y que era cuando

sobrexpresábamos GlialCAM cuando la corriente mediada por CIC-2 se veía modificada, pensamos en situaciones que pudieran aumentar los niveles de GlialCAM *in vivo*, y que eso pudiera repercutir en segunda instancia a que CIC-2 cambiara su localización cambiando sus propiedades de canal. Decidimos estudiar dos condiciones diferentes: condiciones de hiposmolaridad y condiciones con un medio extracelular con alto contenido en potasio, simulando una alta actividad neuronal. Pensamos que tal vez imitando estas condiciones podríamos observar algún cambio en los niveles de expresión o en la localización de GlialCAM o CIC-2.

Mirando niveles de expresión por WB tras tratar astrocitos primarios de rata con medios fisiológico, hiposmótico o despolarizante (alto contenido en potasio) pudimos ver que las proteínas MLC1, GlialCAM y CIC-2 no veían afectados sus niveles de expresión proteica (Figura 107).

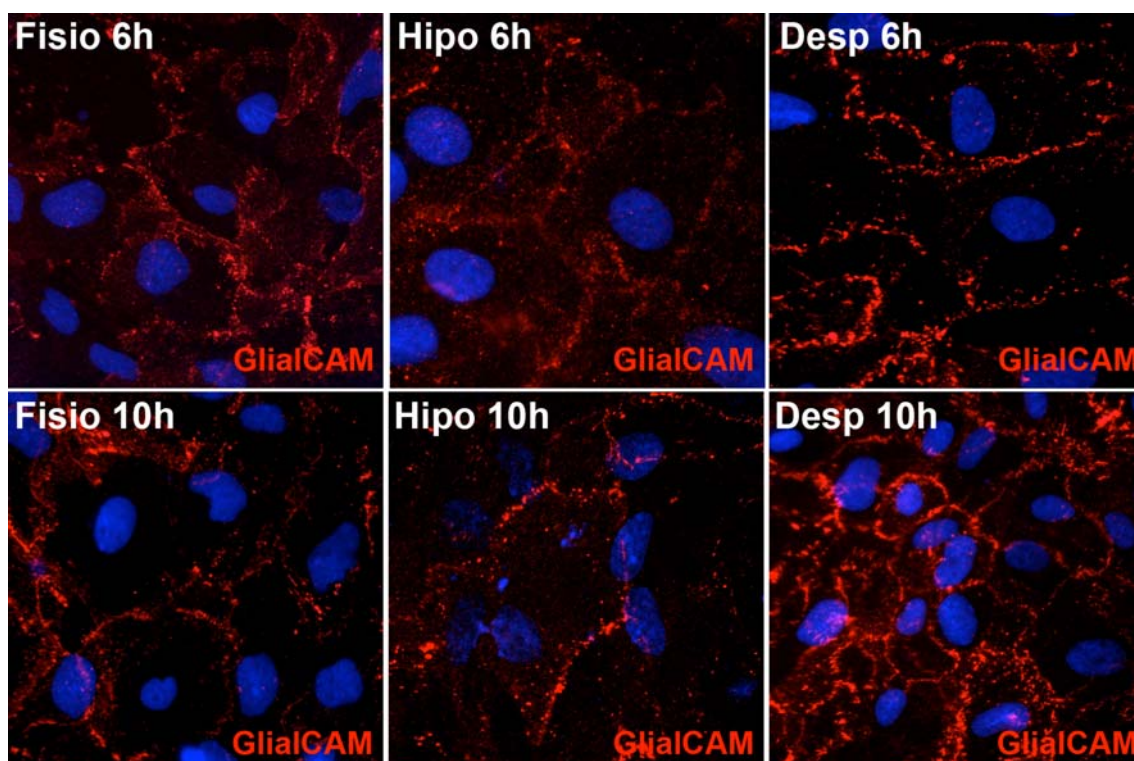


**Figura 107: El tratamiento de astrocitos primarios de rata con medio hiposmótico o con alto contenido en potasio no altera los niveles de expresión de CIC-2, GlialCAM o MLC1.** Astrocitos primarios de rata diferenciados durante 3 semanas con AraC fueron tratados durante varios tiempos (1 hora, 3 horas, 6 horas, y 10 horas) con medios fisiológico (F), hiposmótico (H) y despolarizante (D) (con alto contenido en potasio). Tras los tratamientos fueron solubilizados y analizados por WB. No se detectan cambios dramáticos en el nivel de expresión de CIC-2, GlialCAM y MLC1 en función de los tratamientos y de los tiempos estudiados. Control de carga realizado con anti  $\beta$  Actina. N=2. Datos similares fueron obtenidos en astrocitos diferenciados con diBAMPc en las mismas condiciones (no mostrado).

El siguiente paso fue estudiar la localización de GlialCAM por inmunofluorescencia tras la aplicación de dichos tratamientos (se empezó por estudiar tiempos largos de tratamiento). Tras hacer inmunofluorescencias



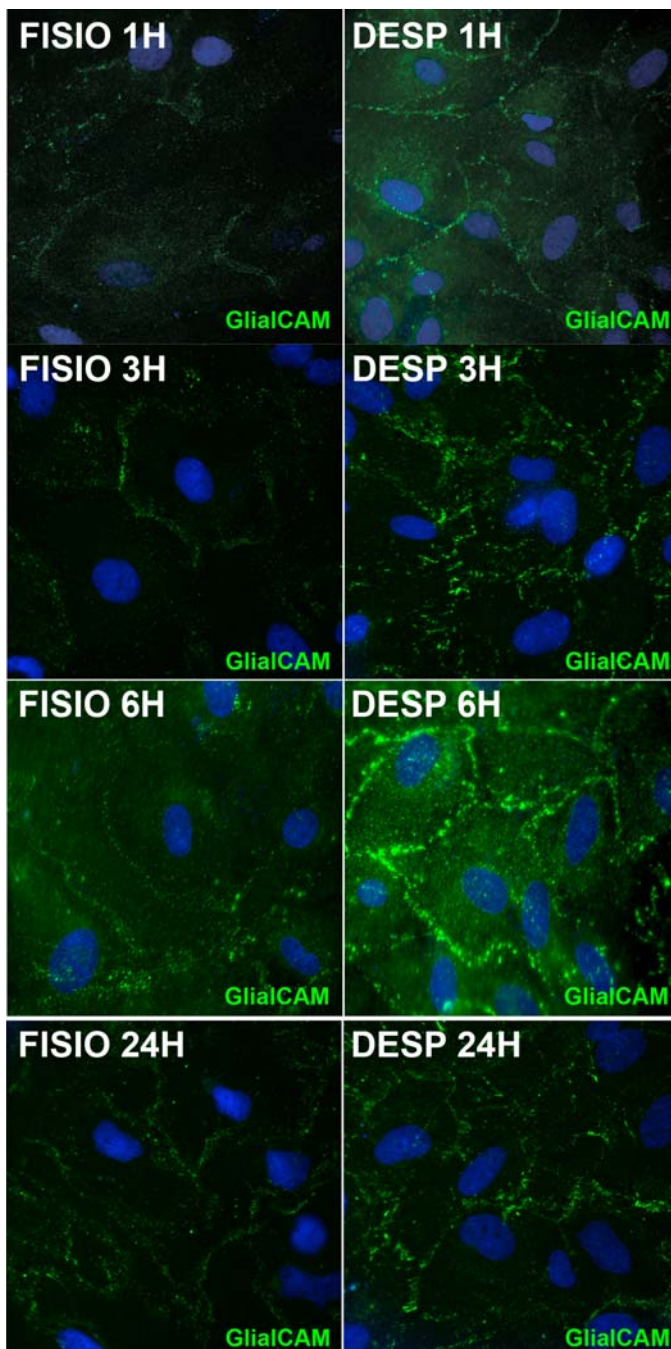
contra GlialCAM, pudimos observar que cuando tratábamos los astrocitos con la solución con alto contenido en potasio, parecía que GlialCAM se expresara más en la membrana plasmática formando contactos con todos los astrocitos vecinos. En cambio, en medio hiposmótico no se observaron cambios significativos en la localización de GlialCAM (Figura 108). No pudimos ensayar la localización de CIC-2 en estos tratamientos porque la marca que daba el anticuerpo era muy difusa, no pudiendo creernos la marca.



**Figura 108:** El tratamiento de astrocitos primarios de rata con un medio con alto contenido en potasio parece aumentar los niveles de GlialCAM en la membrana plasmática. Astrocitos primarios de rata diferenciados durante 3 semanas con AraC fueron tratados durante varios tiempos (6 y 10 horas) con medios fisiológico (F), hiposmótico (H) y despolarizante (D) (con alto contenido en potasio). Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Datos similares fueron obtenidos en astrocitos diferenciados con diBAMPc en las mismas condiciones (N=2) (no mostrado).

Posteriormente, decidimos analizar si GlialCAM aumentaba sus niveles en la membrana plasmática haciendo inmunofluorescencias sin permeabilizar y utilizando el anticuerpo monoclonal que disponíamos contra una región de la

parte extracelular de GlialCAM. Se realizaron tratamientos a diferentes tiempos, y la toma de imágenes así como el tratamiento posterior de las mismas se llevó a cabo en las mismas condiciones. Pudo observarse que la señal de GlialCAM en condiciones de alto contenido en potasio es más intensa que en el caso del tratamiento de los astrocitos con medio fisiológico (Figura 109). Esta señal aumentaba incluso a tiempos cortos (1 hora).

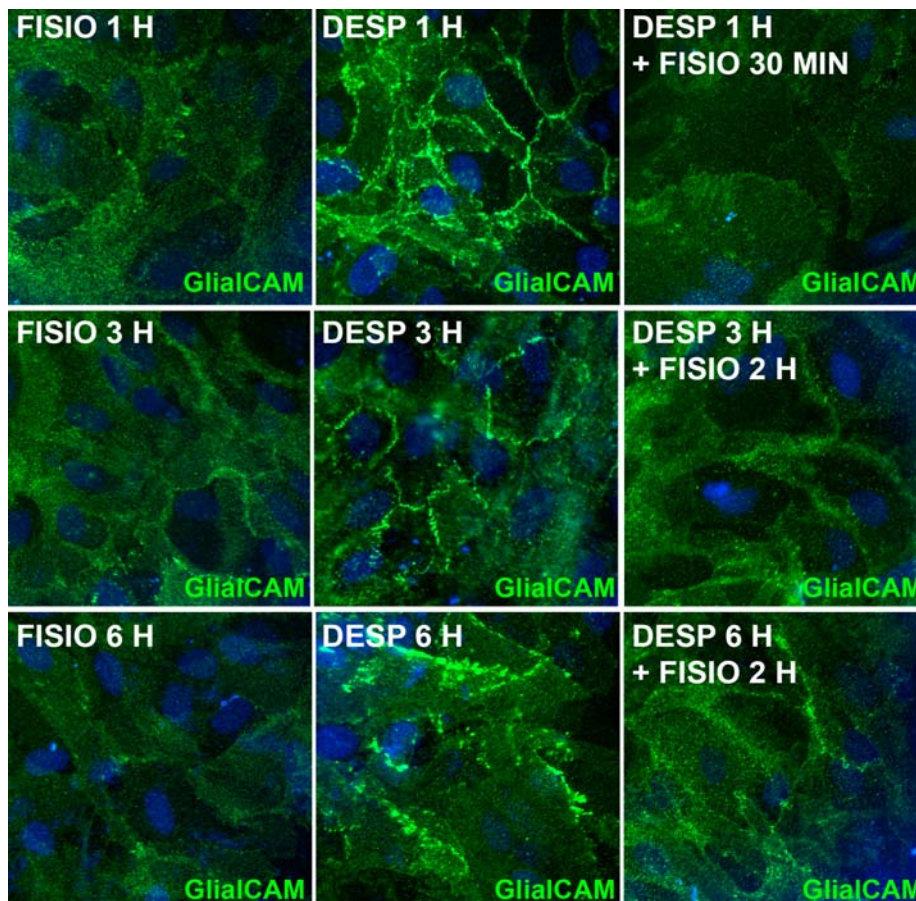


**Figura 109: GlialCAM presenta una señal fluorescente más intensa en la membrana plasmática cuando los astrocitos son tratados con medio rico en potasio.** Astrocitos primarios de rata diferenciados durante 3 semanas con AraC fueron tratados durante varios tiempos (1, 3, 6 y 24 horas) con medios fisiológico (FISIO), y con alto contenido en potasio (DESP). Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y sin permeabilizar se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra la parte extracelular de GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Las imágenes fueron capturadas a 40X sin usar el *spinning disk*, y todas en las mismas condiciones de ganancia y de intensidad de fluorescencia. El tratamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa *ImageJ* y se aplicó a todas las imágenes las mismas condiciones.

Otra aproximación que se hizo fue analizar la expresión de GlialCAM por citometría tras la realización de una inmunofluorescencia sin permeabilizar y usando el mismo anticuerpo monoclonal dirigido contra la parte extracelular de GlialCAM. En este ensayo sin embargo, no observamos diferencias entre la condición de medio fisiológico y la de medio con alto contenido en potasio. También se intentaron experimentos de biotilización de GlialCAM en la membrana tras dichos tratamientos. Sin embargo, no obtuvimos éxito, seguramente porque se requieren de más experimentos para poner a punto dicha técnica.

Quisimos estudiar si el efecto que veíamos era específico. Para ello seguimos varias aproximaciones. Una de ellas fue analizar si dicho efecto era reversible si volvíamos a incubar los astrocitos con medio fisiológico después de haberlos tratado previamente con medio rico en potasio. Los resultados preliminares que obtuvimos indicaban que el efecto que GlialCAM se concentrara más en la membrana plasmática tras el tratamiento con un medio con potasio se revertía cuando los incubábamos posteriormente con un medio fisiológico, sugiriendo esto que el efecto fuera específico (Figura 110).

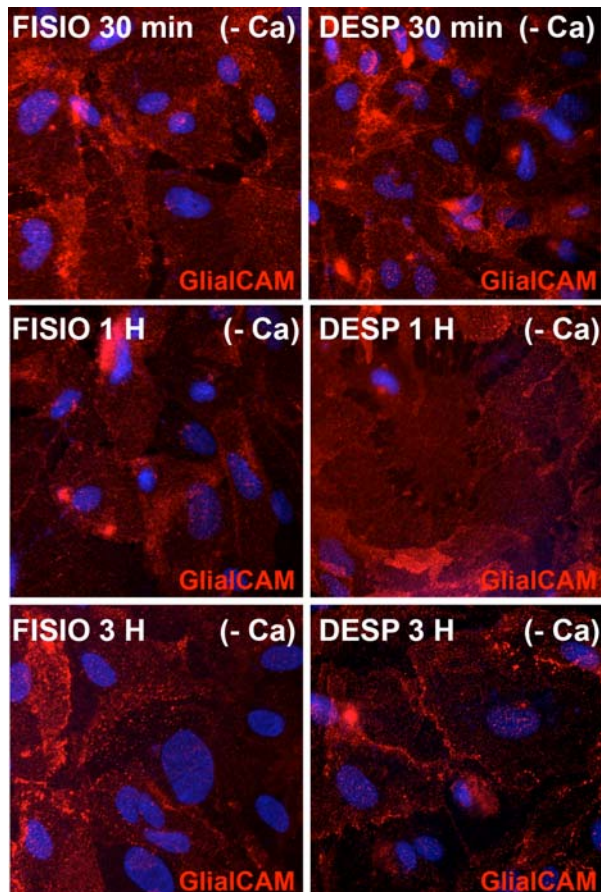




**Figura 110: El tratamiento de los astrocitos con medio fisiológico después de aplicarles un tratamiento con un medio rico en potasio parece revertir la concentración de GialCAM en la membrana plasmática.** Astrocitos de rata diferenciados 3 semanas con AraC fueron tratados durante varios tiempos (1, 3 y 6 horas) con medios fisiológico (FISIO) y despolarizante (DESP) (con alto contenido en potasio), y posteriormente con medio fisiológico. Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra GialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas (t=1h, N=3; t=3h, N=2; t=6h, N=1).

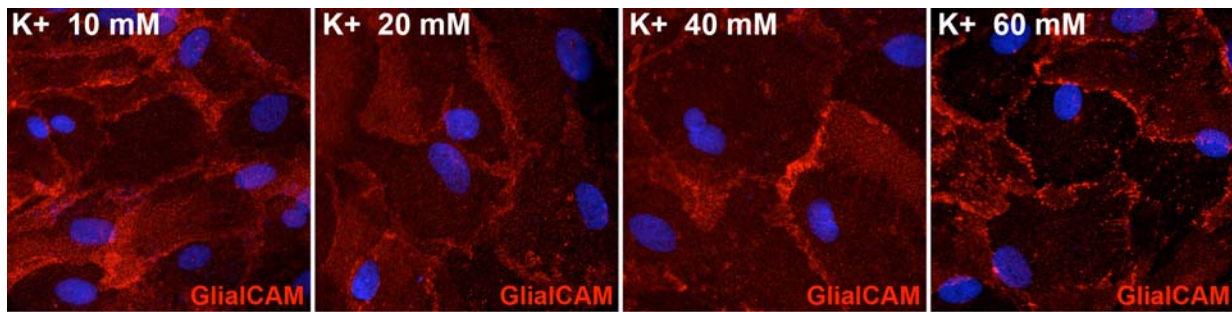
Otra aproximación que hicimos fue quitar el calcio de nuestras soluciones de tratamiento. Decidimos hacer esto porque pensamos que tal vez el efecto que debíamos era un efecto indirecto, debido a que la incubación con un medio con un alto contenido en potasio pudiera estar activando canales de calcio dependientes de voltaje u otras proteínas que llevaran a cabo señalización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y que ésta conllevara en segunda instancia a que hubiera más GialCAM en la membrana plasmática. Sin embargo, el efecto que encontramos fue que los astrocitos presentaban una morfología diferente,

y el marcaje de GlialCAM era difuso y muchas veces alrededor del núcleo en agregados (Figura 111). No pudimos sacar conclusiones porque seguramente el quitarle todo el calcio era perjudicial para los astrocitos. La siguiente opción a testar sería usar otros agentes quelantes pero dejando en la solución algo de calcio.



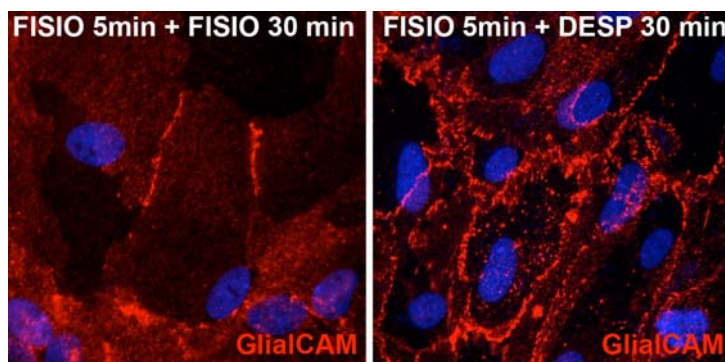
**Figura 111: Eliminar el calcio de las soluciones fisiológica y despolarizante (rica en potasio) no nos dio información relevante, ya que los astrocitos no presentaban una morfología normal y GlialCAM aparecía en agregados alrededor del núcleo, incluso en la solución fisiológica.** Astrocitos de rata diferenciados 3 semanas con AraC fueron tratados durante varios tiempos (30 minutos, 1 y 3 horas) con medios fisiológico (F) y despolarizante (D). Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk* DSU Olympus (N=2).

También se procedió a reducir la concentración de potasio hasta encontrar la mínima a la que obteníamos un efecto. Así, se redujo desde 60 mM hasta 10 mM. Sin embargo, donde el efecto era más claro era a la concentración máxima de 60 mM (Figura 112).



**Figura 112:** El mayor efecto de la asociación de GlialCAM en la membrana plasmática ocurre a una concentración de KCl de 60 mM. Astrocitos de rata diferenciados 3 semanas con AraC fueron tratados durante 1 hora con medio fisiológico (no mostrado) y con medio despolarizante (alto contenido en  $K^+$ ) a varias concentraciones (10 mM, 20 mM, 40 mM y 60 mM). Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* (N=2).

Finalmente, se aplicó otro protocolo basado en el trabajo de (Yaguchi and Nishizaki). Siguiendo este protocolo parecía que a 30 minutos ya se observaba el efecto de mayor confinamiento de GlialCAM en la membrana plasmática (Figura 113).



**Figura 113:** El tratamiento de astrocitos con un medio rico en potasio parece aumentar los niveles de GlialCAM en la membrana a los 30 minutos. Astrocitos primarios de rata diferenciados durante 3 semanas con AraC fueron tratados durante 5 minutos con medio fisiológico y seguidamente con medio despolarizante (alto contenido en potasio). Tras los tratamientos, los astrocitos fueron fijados y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra GlialCAM. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* (N=2). El experimento también se realizó usando medios fisiológico y despolarizante sin calcio, pero los resultados no fueron concluyentes (no mostrado).

## 7. DISCUSIÓN.

La búsqueda de redes proteicas que puedan darnos una relevancia funcional a los procesos celulares es una tarea compleja. Al desconocer la función que MLC1 está llevando a cabo ha hecho que no se pueda comprender

el mecanismo patofisiológico de la enfermedad y que por ello, no se hayan desarrollado terapias efectivas para los pacientes. Asimismo, tampoco se sabía explicar la enfermedad en los pacientes de MLC sin mutaciones en *MLC1*.

Nuestro grupo apostó por intentar identificar y analizar el interactoma de *MLC1* como vía para encontrar moléculas que interaccionaran con *MLC1* y así ayudarnos a esclarecer cuál es la función que está desempeñando. Esto a su vez nos podría permitir intentar encontrar el segundo gen responsable de la enfermedad en el 25% de pacientes afectados de MLC pero que no presentaban mutaciones en *MLC1*.

Para la identificación del interactoma de *MLC1*, usamos 2 aproximaciones: la variante del sistema de doble híbrido *split-ubiquitin* porque permite la investigación de interacciones entre proteínas de membrana; y la inmunopurificación por afinidad seguida de espectrometría de masas. Con ellas obtuvimos una lista de proteínas candidatas, aunque en ningún caso obtuvimos solapamiento entre las dos aproximaciones empleadas, que era lo que nosotros esperábamos. No obstante, ambas metodologías presentan limitaciones, pudiendo dar lugar a falsos positivos. Por ejemplo, en la inmunopurificación por afinidad se pueden obtener proteínas que no necesariamente interaccionan directamente, aunque pertenezcan al mismo complejo proteico. Lo ideal sería poder repetir las inmunopurificaciones usando cerebros de ratones *knock-out* para *MLC1*. De esta manera, podríamos eliminar una amplia gama de proteínas que serían falsos positivos.

Es por ello que es también muy importante disponer de varias metodologías que te permitan confirmar que las proteínas candidatas obtenidas son verdaderos interactores de tu proteína. El haber analizado diferentes



interacciones ya descritas en la literatura por la metodología de *BiFC* y *BiLC* nos ha permitido decir que estos métodos funcionan y pueden ser específicos. No obstante, hay que tener en consideración la conformación de las fusiones de las mitades de las proteínas reporteras (Venus o GLuc), pues no en todas las posibilidades hemos sido capaces de detectar las interacciones. Puede ser que la fusión de la mitad de Venus o GLuc en el extremo C- o N- terminal de una proteína afecte al lugar de interacción y que por eso, no pueda ocurrir la reconstitución y no podamos detectar una interacción. También puede ocurrir que la fusión de lugar a una proteína aberrante que se degrade fácilmente. Otro punto a tener en cuenta es la señal inespecífica que muchas veces se obtiene. La proteína Venus es sensible a altas temperaturas (Shyu et al., 2006), lo que hace que en muchas ocasiones haya un ensamblaje espontáneo de las dos mitades independientemente de las proteínas interactuantes, incrementando el *ratio* señal/ruido y comprometiendo su utilidad para detectar interacciones entre proteínas. En cambio, en la técnica de *BiLC* se consigue un buen ratio señal/ruido, pudiendo ser un método muy específico. El problema es cuando la expresión de la proteína con toda la luciferasa fusionada es baja, pues no podremos discernir entre lo que es señal de interacción y lo que es señal inespecífica, porque nos moveremos en el rango del ruido, ya que cuando hacemos la complementación solemos obtener una señal entre el 1 y el 5% de la señal máxima. La gran ventaja del método de *BiFC* es el poder visualizar el lugar preciso donde ocurre la interacción. Sin embargo, el método de complementación que finalmente nos permitió validar la interacción entre MLC1 y GlialCAM y entre GlialCAM y CIC-2 fue el método de complementación

de la actividad TEV proteasa (*split-TEV*). Este método era mucho más sensible, ya que permite una una amplificación de la señal.

De toda la lista de proteínas candidatas, se analizó el gen de *GLIALCAM* en diferentes pacientes de MLC sin mutaciones en *MLC1*, ya que era la segunda proteína más asociada a *MLC1* (después de ella misma). Y resultó estar mutado en la mayoría del 25% de pacientes de MLC sin mutaciones en *MLC1*. Lo curioso de estas mutaciones, es que cuando los pacientes presentaban 2 mutaciones (herencia recesiva) en *GLIALCAM*, los pacientes presentaban las mismas características clínicas que los pacientes clásicos con mutaciones en *MLC1*. En cambio, cuando los enfermos presentaban sólo una mutación en *GLIALCAM* (herencia dominante), éstos mejoraban a lo largo del tiempo.

El problema es que las funciones de GlialCAM y *MLC1* todavía hoy son desconocidas. Es por ello que además no entendemos el mecanismo de mejora de la enfermedad en el caso de las mutaciones dominantes. Existe un trabajo donde se indica que existe un ratón KO para GlialCAM, pero el fenotipo de dichos ratones no ha sido descrito (Favre-Kontula et al., 2008).

Lo que sí podemos decir es que *MLC1* y GlialCAM interactúan directamente, ya que pudo observarse interacción positiva entre ambas moléculas en células heterólogas después de ser transfectadas por inmunofluorescencia, co-inmunoprecipitación, *FRET* o por experimentos de *split-TEV*. Además, GlialCAM está actuando como subunidad beta para *MLC1*, siendo necesaria para dirigir su tráfico celular a las uniones célula-célula, ya que *MLC1* por sí misma no puede localizarse en ellas. El hecho que GlialCAM sea necesario para localizar a *MLC1* en los contactos célula-célula tiene

similitud con el papel que hacen muchas otras moléculas de adhesión. Un ejemplo son las nectinas, que están implicadas en la asociación ordenada de axones y dendritas, y por tanto, son cruciales para la formación de las sinapsis (Sakisaka and Takai, 2004), (Togashi et al., 2009). Otro ejemplo es el papel que juegan las contactinas en la localización de los canales de sodio y potasio en los distintos subdominios del nódulo de Ranvier en el SNC (Shimoda and Watanabe, 2009).

Por otro lado, GlialCAM presenta una proteína homóloga, llamada HepaCAM2, la cual tiene una topología similar pero conteniendo tres dominios inmunoglobulina (Ig) extracelulares en el extremo N-terminal en lugar de los dos que presenta GlialCAM. Ambas proteínas son homólogas estructurales de otras moléculas de adhesión celular de la subfamilia CD2 de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*) y las ESAMs (*Endothelial-Selective Adhesion Molecules*) (Chung Moh et al., 2005), (Moh et al., 2005). No obstante, la molécula de adhesión a la que GlialCAM presenta mayor homología de secuencia es a la proteína CD229 (Ly9) (Sintes et al., 2007), perteneciente a la familia de proteínas SLAMs (*Signalling Lymphocytic Activation Molecules*) (Engel et al., 2003), las cuales son receptores que contribuyen a la activación de las células T y de las células NK durante la respuesta del sistema inmune.

Las moléculas de adhesión JAMs poseen dos dominios *Ig-like* ( $V_H$  y  $C_2$ ) en la parte extracelular de la proteína, un segmento transmembrana y una corta cola citoplasmática, la cual contiene motivos de unión a dominios PDZ (de tipo I y II) (Bazzoni, 2003), (Ebnet et al., 2003), (Ebnet et al., 2004), (Keiper et al., 2005). GlialCAM presenta la misma estructura aunque su motivo de

unión a PDZ es de tipo III. Estas moléculas forman homodímeros en *cis*, los cuales son importantes para dar lugar a las interacciones en *trans* con moléculas presentes en la membrana de células opuestas. Por tanto, pueden llevar a cabo interacciones homofílicas pero también heterofílicas. Comparando la secuencia de los dominios Ig en estas proteínas observamos que los residuos del dominio IgC<sub>2</sub> están más conservados que los del dominio IgV. Las interacciones heterofílicas de las moléculas JAMs con las integrinas leucocitarias ocurre vía el dominio C<sub>2</sub>. Sin embargo, las dimerizaciones en *cis* y las interacciones homofílicas en *trans* las llevan a cabo mediante el dominio IgV. Se podría por tanto especular que las posibles interacciones de GlialCAM tanto en *cis* como en *trans* podrían ocurrir también a través de este dominio IgV. Es posible que para que GlialCAM también lleve a cabo interacciones en *trans* sea necesario primero la dimerización en *cis*. Se sabe que GlialCAM forma predominantemente dímeros en *cis* en el mismo plano de una membrana de una célula individual (Moh et al., 2005). Las mutaciones dominantes encontradas en *GLIALCAM* se concentran en el dominio inmunoglobulina IgV, por lo que podrían estar provocando fallos bien en la dimerización en *cis* para permitir que ocurran las interacciones en *trans* homofílicas, o bien directamente fallos en las interacciones en *trans* con otras moléculas desconocidas. De hecho, lo que hemos visto es un defecto en la homo-oligomerización de GlialCAM con las variantes proteicas portadoras de mutaciones en *GLIALCAM* mediante los ensayos de interacción por *split-TEV*, y un defecto en el tráfico de la mayoría de estas variantes, ya que llegan en menor medida que la proteína GlialCAM salvaje a los contactos célula-célula. Pudiera ser que esta homo-oligomerización sea indispensable para su correcto tráfico celular. Las



mutaciones en *GLIALCAM* afectan también en segunda instancia al tráfico de MLC1 a las uniones célula-célula. Puede ser que MLC1 lleve a cabo su función en dichas uniones celulares. Este defecto en el tráfico celular también se ha observado en el caso de mutaciones *missense* en la molécula de adhesión L1 que dan lugar al síndrome L1, donde la proteína se queda retenida en el RE y presenta una menor llegada a la superficie celular, viéndose obstaculizadas las uniones homofílicas y heterofílicas de L1 con sus ligandos (Schafer et al., 2010).

El haber delecionado la parte extracelular de GlialCAM o su cola citoplasmática tenía el objetivo de aportarnos información acerca de encontrar algún dominio que estuviera implicado en el tráfico de GlialCAM a los contactos celulares. La deleción de la cola citoplasmática mostraba que la proteína no era capaz de concentrarse en las uniones celulares en la misma medida que GlialCAM salvaje, localizándose preferentemente en la membrana plasmática. Esto cuadra con los resultados de (Moh et al., 2005), donde eliminando varias regiones del dominio citoplasmático veían que la proteína quimérica no veía afectado su tráfico a la membrana plasmática. Con nuestros resultados nosotros podemos concluir que dicho dominio no es esencial para el tráfico a la membrana pero quizá sí para la localización específica en los contactos célula-célula.

El hecho que la sobre-expresión de GlialCAM junto a dos variantes mutadas de MLC1 (S246R y P92S) aumente la expresión de dichas proteínas en la superficie celular y sean capaces de llegar a las uniones astrocitarias, podría hacer pensar en utilizar dicha sobre-expresión como una estrategia terapéutica, ya que parece que GlialCAM esté favoreciendo el escape de estas

proteínas mutantes de la retención asociada al RE o a la degradación lisosomal.

Durante esta Tesis se ha conseguido identificar no solo a *GLIALCAM* como segundo gen implicado en MLC, sino que también se ha encontrado que GlialCAM es capaz de interactuar con el canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2, tanto a nivel bioquímico como a nivel funcional. Asimismo, se ha visto que esta interacción es específica, ya que no se observa interacción con la proteína homóloga de GlialCAM, HepaCAM2 (experimentos realizados por mi compañero de laboratorio Xavier Capdevila, (Jeworutzki et al., 2012).

Dado que CIC-2 es capaz de funcionar en ausencia de GlialCAM (con diferentes propiedades), y puesto que GlialCAM muestra un patrón de expresión más restrictivo que CIC-2 (Thiemann et al., 1992), nosotros proponemos que GlialCAM no es una subunidad-β obligada de CIC-2, pero sí una subunidad auxiliar capaz de asociarse con CIC-2 tal vez sólo en algunas células o en algunas circunstancias. MLC1, sin embargo, no modifica las corrientes de CIC-2 ni en presencia ni en ausencia de GlialCAM. Además, la mayoría de aproximaciones que se han llevado a cabo en el grupo para intentar encontrar una relación directa entre MLC1 y CIC-2 (estudios realizados por Logopharm, estudios de (Duarri et al., 2011), y estudios de co-inmunoprecipitación en células transfectadas) indican que CIC-2 y MLC1 no interactúan directamente. Sólo ha sido con la técnica de *split-TEV* y en una conformación posible donde hemos podido ver dicha interacción, por lo que debido a estas discrepancias no podemos afirmar ni excluir que MLC1 y CIC-2 interactúen directamente. Asimismo, estudios de inmunohistoquímica en el ratón KO de CIC-2 muestran la localización de MLC1 y GlialCAM inalteradas

(Jeworutzki et al., 2012). Por tanto, todo esto hace sugerir que GlialCAM-MLC1 y GlialCAM-CIC-2 pudieran estar formando distintos complejos, aunque ellos podrían estar funcionalmente relacionados.

Lo que está claro es que GlialCAM es capaz de localizar a CIC-2 y MLC1 en los contactos célula-célula, tanto en células transfectadas como en astrocitos primarios. Las variantes proteicas portadoras de mutaciones en *GLIALCAM* relacionadas con MLC no afectan a la interacción bioquímica y funcional de estas proteínas con CIC-2. Dan lugar a que tanto MLC1 como CIC-2 no sean dirigidas correctamente a las uniones celulares. Por tanto, la función de GlialCAM podría ser necesaria para agrupar a ambas proteínas en tales uniones, particularmente en los pies terminales astrocitarios, donde podrían estar llevando a cabo su función. CIC-2 podría ser necesario para desarrollar un flujo de  $\text{Cl}^-$  transcelular o para compensar gradientes electroquímicos iónicos que pueden estar ocurriendo en dichas uniones durante cambios en la osmolaridad. Este flujo de  $\text{Cl}^-$  mediado por CIC-2/GlialCAM en las uniones parece no estar influenciado por las uniones tipo *gap*, ya que su bloqueo no modificaba las corrientes inducidas por la sobreexpresión de GlialCAM en los astrocitos. Además, la sobreexpresión de GlialCAM no alteraba los niveles de expresión de la conexina 43 ni afectaba su localización subcelular.

Por otra parte, la delección de la cola citoplasmática de GlialCAM parece no afectar a la interacción con CIC-2 ni a la localización del canal en las uniones célula-célula, sugiriendo que este dominio podría no ser clave en la interacción entre GlialCAM y CIC-2.

La función de CIC-2 *per se* sigue siendo desconocida. Podría ser necesario para regular el pH en el espacio extracelular, por ejemplo, reciclando

el Cl<sup>-</sup> de los intercambiadores de Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub>. También se ha propuesto que en las neuronas, CIC-2 podría ser requerido para eliminar el exceso del Cl<sup>-</sup> extracelular generado en las sinapsis gabaérgicas (Foldy et al., 2010). Por otro lado, existen fuertes evidencias a favor de que CIC-2 ejerza un importante papel en las células gliales. Esto se sugiere debido al fenotipo del ratón *Clcn2*<sup>-/-</sup>, el cual presenta una vacuolización en el cerebro similar al encontrado en los pacientes de MLC (Blanz et al., 2007). Se sugiere que CIC-2 podría ser necesario para regular la concentración de potasio en el espacio extracelular durante la actividad neuronal, ya que se sabe que la glía actúa recogiendo el exceso de potasio que se da lugar durante una elevada actividad neuronal. En dicho proceso se sabe que están implicados varias proteínas como son las conexinas 47 y 32 (Kleopa et al., 2004), la aquoporina 4 y el canal de potasio *inward rectifier* Kir4.1 (Butt and Kalsi, 2006), (Neusch et al., 2006).

Kir 4.1 es expresado en el *endfeet* astrocitario y en los somas de los oligodendrocitos (Neusch et al., 2001), (Butt and Kalsi, 2006). La depleción del Kir4.1 así como el doble *knock out* de Cx32 y Cx47 dan lugar a vacuolas asociadas a la mielina en el SNC (Neusch et al., 2001), (Menichella et al., 2003), las cuales son parecidas a las observan en el *knock out* de CIC-2. Sin embargo, el ratón KO de Kir4.1 presenta además pérdida neuronal y déficits neuronales que no se observan en el ratón KO para CIC-2. Lo que hoy en día se sugiere es que tanto Kir4.1 como las conexinas 32 y 47 podrían funcionar juntas en el proceso de tamponamiento del potasio extracelular, y que la vacuolización de la mielina es provocada por la actividad neuronal. Por ejemplo, la vacuolización del nervio óptico del doble KO cx32/47 y del Kir4.1 comienza después de la apertura del ojo y puede ser suprimida por la inhibición

de la actividad del nervio óptico con tetradotoxina (Menichella et al., 2003), (Neusch et al., 2001). Por otro lado, el ratón KO de CIC-2 presenta una degeneración temprana de la retina que resulta en una casi completa ceguera desde el nacimiento (Bosl et al., 2001). Pero en este caso, la retina del ratón no presenta vacuolización, lo cual sugiere que la vacuolización depende de la actividad neuronal, puesto que como la retina está degenerada prácticamente al nacer y no hay actividad neuronal que de lugar a cambios dinámicos en las concentraciones iónicas extracelulares, podría explicar que el ratón KO para CIC-2 no presente vacuolización en dicha estructura. Por otro lado, que el eflujo de  $\text{Cl}^-$  por parte de CIC-2 ocurra en los pies astrocitarios es plausible porque ahí mismo se encuentra el canal de potasio Kir 4.1 que media el eflujo paralelo de potasio (incrementándose la probabilidad de apertura de CIC-2 por hiperpolarización). En cambio, un influjo de  $\text{Cl}^-$  vía CIC-2 es más fácilmente imaginable en los oligodendrocitos (Walz, 2002), pues el potencial electroquímico para el  $\text{Cl}^-$  estará ahí más probablemente en equilibrio. Es por ello que se propone que CIC-2 podría servir tanto para el influjo como el eflujo de  $\text{Cl}^-$ , influenciado por los gradientes electroquímicos dependientes de la actividad en los distintos sitios subcelulares (Blanz et al., 2007).

Sin embargo, las corrientes registradas tanto en cultivos de astrocitos (Ferroni et al., 1997) como en rodajas de cerebro (Makara et al., 2003) muestran el patrón típico de CIC-2 solo, no muestran la menor rectificación de entrada que se observa cuando co-expresamos CIC-2 y GlialCAM. Esto puede ser debido a diferentes condiciones de registro, o porque tal vez la co-expresión de GlialCAM-CIC-2 puede ser necesaria solo bajo condiciones especiales, como aquellas que ocurren durante una alta actividad neuronal.

El conjunto de resultados donde hemos incubado los astrocitos con un medio con alto contenido en potasio para simular una elevada actividad neuronal son preliminares, ya que están poco trabajados debido a que se realizaron en la última etapa de la Tesis. Requieren de más experimentos para poder validar si este efecto es específico o no. No obstante, estamos asumiendo que esta mayor localización de GlialCAM en la membrana plasmática tiene una relevancia funcional con CIC-2. Desafortunadamente, no hemos podido hacer el mismo tipo de estudios de inmunolocalización de CIC-2 tras dichos tratamientos, porque el anticuerpo que disponemos no es muy eficiente para inmunocitoquímica, por lo que no hemos podido validar si CIC-2 también aumenta su expresión en superficie cuando se incuba con un medio con alto contenido en potasio. Es por ello que los experimentos claves para verificar si este estímulo tiene una relevancia funcional entre GlialCAM y CIC-2 serían experimentos electrofisiológicos de *Patch-Clamp*. Sería interesante analizar qué le ocurre a la corriente de CIC-2 tras incubar los astrocitos con un medio rico en potasio. Si la corriente se modifica de manera similar a como ocurre cuando sobreexpresamos GlialCAM habríamos encontrado el estímulo que podría ocurrir *in vivo* para que ambas moléculas actúen juntas, ya que CIC-2 tiene actividad de canal por sí mismo.

Es posible que el complejo ternario MLC1/GlialCAM/CIC-2 se forme solo bajo determinadas situaciones, como por ejemplo una alta actividad neuronal. Pudiera ser por eso que los estudios de co-inmunoprecipitación hechos por Logopharm no fueran positivos a la hora de co-inmunoprecipitar CIC-2 cuando usaban anticuerpos contra MLC1 porque la expresión de dicho complejo ternario fuera muy baja, ya que se realizó en condiciones nativas. Sería

interesante repetir experimentos de co-inmunoprecipitación en astrocitos sobreexpresando las 3 proteínas y usando el detergente *complexolite 47a*. Se podría también analizar si tratando los astrocitos con medio rico en potasio aumenta el nivel de co-inmunoprecipitación. Más estudios y más técnicas (como por ejemplo, FRET) deben ser realizadas para intentar dilucidar si existe interacción directa entre MLC1, GlialCAM y CIC-2. Otra aproximación podría ser estudiar qué le pasa a las corrientes de CIC-2 en un modelo astrocitario deplecionado de GlialCAM o de MLC1, así como estudiarla en dichos ratones KO.

Así, nosotros hipotetizamos que la pérdida del efecto estimulador de GlialCAM sobre CIC-2 o su deslocalización puede dar lugar a un defecto en el transporte de  $\text{Cl}^-$  glial, lo cual podría alterar el proceso de tamponación del potasio extracelular o la homeostasis del  $\text{Cl}^-$  que ocurre durante la actividad neuronal o la regulación del volumen. Esto desembocaría en una acumulación osmótica de agua que daría lugar a la vacuolización observada en los pacientes de MLC con mutaciones en *GLIALCAM* o en el ratón *Clcn2<sup>-/-</sup>*. Sin embargo, estas ideas deben ser probadas.

El descubrimiento de GlialCAM como una subunidad auxiliar de CIC-2 incrementa la compleja regulación de este canal y proporciona nuevas ideas acerca del papel que CIC-2 puede estar desempeñando en las células gliales así como se sugiere que pueda estar involucrado en la fisiopatología de MLC

## **CAPÍTULO 3**

**Estudios iniciales para la obtención  
de modelos animales de la  
enfermedad MLC en el pez cebra**





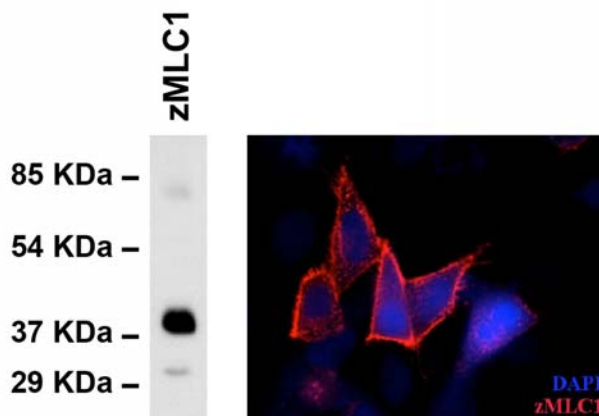
Las ventajas que ofrece *Danio rerio* para ser utilizado como modelo animal de enfermedad ha hecho que haya sido elegido por nuestro grupo para ahondar en la patofisiología de la enfermedad MLC. Las principales ventajas del pez cebra como modelo animal son la capacidad de aplicar técnicas genéticas a gran escala y la claridad óptica de los embriones, lo que permite una visualización *in vivo* y en tiempo real del desarrollo (Lieschke and Currie, 2007). En el campo de la neurobiología es un modelo que también puede ser útil, ya que lleva a cabo el proceso de mielinización axonal (Brosamle and Halpern, 2002). Como en la enfermedad MLC ocurre un deterioro de la mielina consideramos que el disponer de este modelo animal puede resultar muy útil para entender mejor la enfermedad.

## **1. CLONAJE DE LA PROTEÍNA ORTÓLOGA DE MLC1 EN EL PEZ CEBRA.**

El primer paso a desarrollar fue clonar el gen ortólogo de MLC1 (zMLC1). Tras el clonaje y verificación por secuenciación, procedimos a expresarlo en células HeLa, ya que queríamos intentar detectar dicha proteína ortóloga con alguno de los anticuerpos que ya disponíamos en el grupo. Sin embargo, ninguno de nuestros anticuerpos fue capaz de detectarla. Es por ello que se decidió encargarse un anticuerpo policlonal contra la proteína MLC1 del pez cebra. Se eligió un péptido situado en la región del extremo N-terminal, ya que sabíamos que anticuerpos en esa región funcionaban bien para la proteína de ratón y la humana.

## 2. PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA ZMLC1.

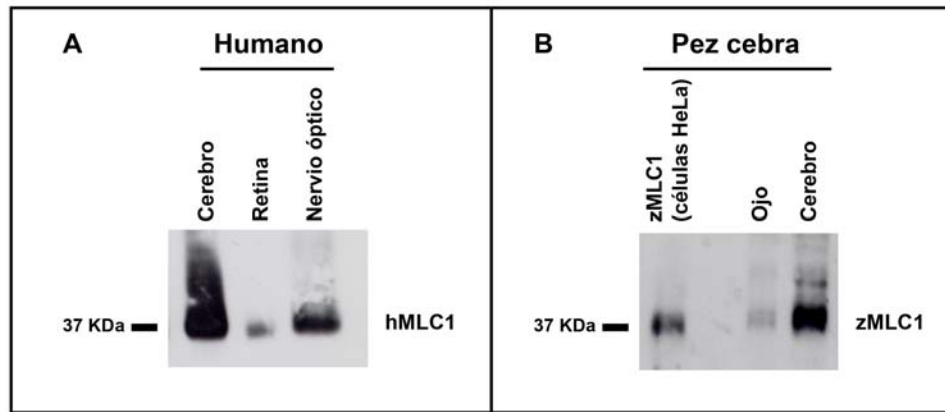
Para verificar que el anticuerpo funcionaba usamos como control positivo extractos de células HeLa transfectadas con el plásmido que expresaba la proteína zMLC1; y como control negativo células HeLa no transfectadas. Así, elegimos hacer 4 inyecciones del péptido al animal y se usó el último sangrado del conejo para purificar el anticuerpo por afinidad del péptido. Dicho anticuerpo se probó por Western blot e inmunofluorescencia en células HeLa transfectadas, detectándola en la membrana plasmática, como ocurre con la proteína humana MLC1 (Figura 114).



**Figura 114: Expresión y localización de zMLC1 en células HeLa transfectadas.** Células HeLa fueron transfectadas con la construcción zMLC1 y fueron analizadas por WB e inmunofluorescencia usando el anticuerpo purificado contra la proteína del pez cebra zMLC1. El anticuerpo funciona bien, ya que se detecta la proteína tanto por WB como por inmunofluorescencia. La imagen fue adquirida en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*.

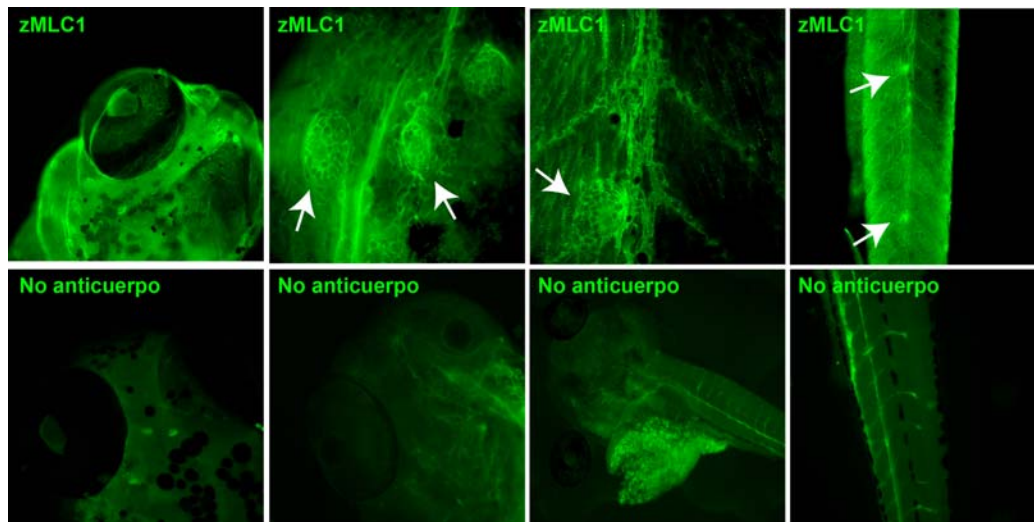
## 3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE ZMLC1 EN EL PEZ CEBRA.

Se procedió a caracterizar el patrón de expresión de la proteína zMLC1 en el pez, para determinar en qué órganos la proteína se expresaba mayoritariamente. En este punto del proyecto iniciamos una colaboración con el grupo liderado por el Dr. Hernan Lopez-Schier (CRG) ya que nosotros no disponíamos de peces ni teníamos experiencia en este campo. Pudimos ver que existía similitud a lo que ocurría en humanos o en el ratón, ya que la proteína se expresaba predominantemente en el cerebro y en menor medida en el ojo, en el pez adulto (Figura 115).



**Figura 115: La expresión de zMLC1 en el pez cebra adulto es similar a lo que ocurre en humanos.** (A) WB de distintos órganos o tejidos humanos donde se detecta la proteína humana MLC1 con el anticuerpo N4 disponible en el grupo. El WB fue realizado por la doctora Anna Duarri. (B) WB de 2 órganos diferentes del pez adulto donde se detecta la proteína del pez cebra zMLC1 usando el anticuerpo recientemente purificado. Como control positivo se usaron células HeLa transfectadas con la proteína zMLC1. Se testaron otros órganos del pez pero no se obtuvo señal (datos no mostrados).

Posteriormente, se procedió a la realización de inmunofluorescencias *whole-mount* sobre embriones de peces de diferentes estadios (desde 24 horas post-fertilización hasta 6 días post-fertilización), ya que queríamos caracterizar el patrón de expresión de la proteína zMLC1 durante el desarrollo del pez. No se encontró una marca clara y específica de alguna estructura en concreto. Se obtenía un marcaje difuso a lo largo del pez, como si fueran las células epiteliales, y en algunos casos parecía que podía haber una marca en células de la retina del ojo, así como en unas agrupaciones de células un tanto elevadas que recordaban a los neuromastos (los neuromastos son los receptores que componen la línea lateral del pez, cada uno compuesto de un grupo de células ciliadas) (Figura 116).



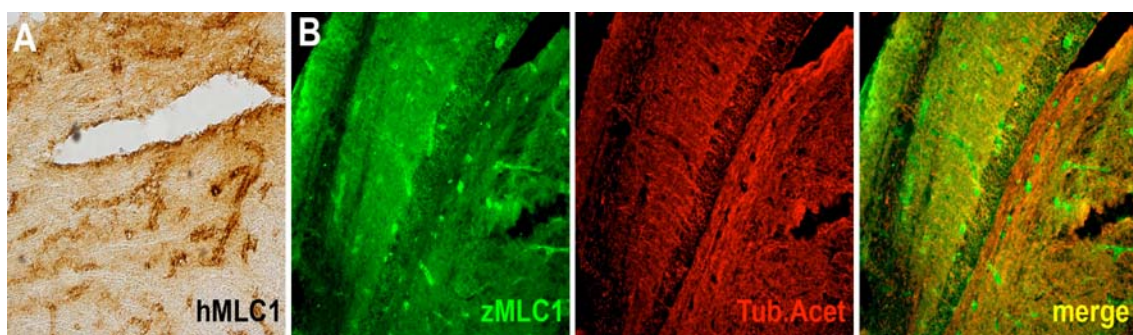
**Figura 116: Marcaje del anticuerpo anti-zMLC1 en embriones de pez cebra de día 5.** Embriones de pez cebra fueron inmunoprocados por fluorescencia *whole-mount* utilizando el anticuerpo purificado anti-zMLC1 (1:100) (Panel de arriba). En el panel de abajo se muestran imágenes de diferentes zonas del pez pero en este caso no tratados con el anticuerpo anti-zMLC1, solamente con el anticuerpo secundario, para tener un control de nuestro anticuerpo. Puede observarse un marcaje difuso a lo largo de todo el pez, pero parece destacar en células del ojo (ya que en el control negativo no se observa ninguna marca), así como en unas estructuras celulares que se agrupan formando cerros o montículos, recordando a la estructura de los neuromastos (flechas).

Sin embargo, no hemos sido capaces de detectar la proteína zMLC1 por WB usando peces de edad embrionaria a pesar de haber probado diferentes soluciones de extracción, con diferentes tipos de detergentes, así como diferente número de embriones para homogenizar.

Además, llegó a nuestro grupo el Dr. Alejandro Barrallo Gimeno, que se encargó de poner a punto todas las instalaciones para que el grupo pudiera disponer de peces, así como poner a punto otro conjunto de técnicas que hasta ahora no se habían podido realizar en nuestro laboratorio. Él se encargó de llevar a cabo la técnica de hibridación *in-situ* para intentar definir por esta técnica el patrón de expresión de zMLC1 durante el desarrollo, pero tampoco funcionó en dichos estadios tempranos, por lo que finalmente no pudimos corroborar el patrón de expresión de zMLC1 en los primeros estadios del desarrollo (por RT-PCR sí era capaz de detectarla). Es por ello que no estamos

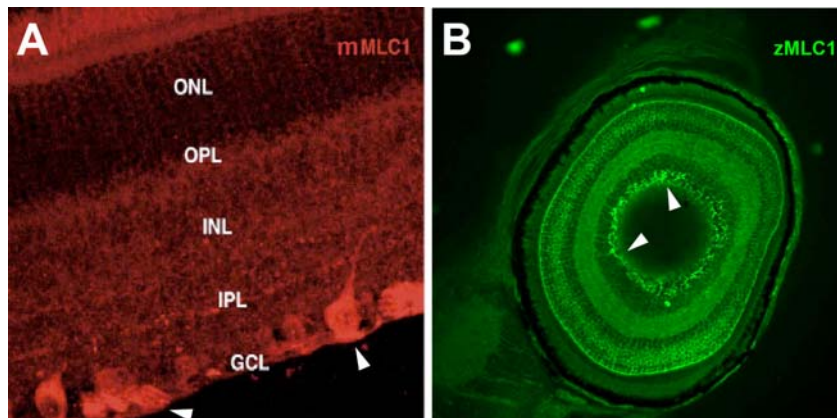
seguros si la marca que obteníamos por inmunofluorescencias *whole-mount* era específica. Para resolver este problema intentamos la generación de un pez transgénico, haciendo una construcción donde insertábamos GFP bajo el promotor de zMLC1, con el objetivo de conseguir visualizar dónde había una marca GFP positiva que nos indicara cuál era el patrón de expresión de zMLC1. Sin embargo, volvimos a fracasar y no conseguimos ver GFP, debido a que obteníamos una alta mortalidad de los peces.

En cambio, el anticuerpo sí parecía funcionar en el caso de estadios adultos, tanto en cerebro como en ojo (ver Figura 115). Por eso, intentamos hacer inmunohistoquímica en dichos tejidos en peces adultos. Éstas fueron realizadas por la Dra. Marisol Montolio. En primer lugar, se llevaron a cabo dobles inmunofluorescencias en el cerebro adulto del pez cebra utilizando nuestro anticuerpo contra la proteína zMLC1 y el anticuerpo monoclonal contra la tubulina acetilada. Se observaba un marcaje alrededor de los vasos sanguíneos, típico del patrón de MLC1 en el cerebro humano y de ratón (Figura 117). No se observaba co-localización con la tubulina acetilada.



**Figura 117: zMLC1 se expresa alrededor de vasos sanguíneos como la proteína MLC1 humana en el cerebro del pez cebra. (A)** Tinción por DAB de hMLC1 con el anticuerpo humano N4 disponible en el grupo. Se observa expresión de hMLC1 alrededor de vasos sanguíneos. **(B)** Doble inmunofluorescencia con anti-zMLC1 (verde) y anti-tubulina acetilada (rojo) donde se puede observar que zMLC1 se expresa también en vasos. Se muestra en amarillo (merge) la co-localización de los dos marcadores. No se observa co-localización.

Asimismo, también se realizaron inmunofluorescencias sobre cortes de ojos. Comparando el marcaje que obteníamos en el ojo del pez con el marcaje obtenido en el ojo del ratón, podía ser que en el pez la proteína zMLC1 se expresara, al igual que en ratón en la capa de células ganglionares. Aún así, son resultados preliminares.



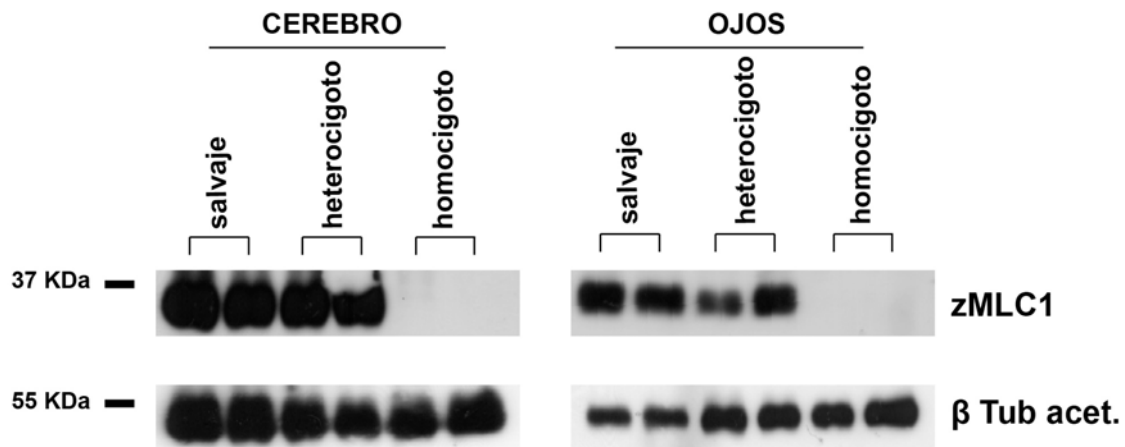
**Figura 118: zMLC1 puede expresarse en la capa de células ganglionares del ojo de manera similar a como lo hace en ratón. (A)** Inmunohistoquímica realizada en ojo de ratón realizada por el Dr. Óscar Tejido con el anticuerpo N4 contra la proteína de ratón. Se observa que mMLC1 se expresa en la GCL (capa de células ganglionares) (flechas). **(B)** Inmunohistoquímica del ojo del pez cebra (realizada por la Dra. Marisol Montolio), donde parece que zMLC1 podría expresarse en la misma capa (señalada con flecha).

#### 4. CREACIÓN DE UN MODELO DE ENFERMEDAD DE MLC EN EL PEZ CEBRA.

Quisimos iniciar el proyecto de la creación de un modelo de MLC en el pez. Así, una aproximación para obtener dicho modelo de enfermedad era disminuir la expresión de la proteína zMLC1 mediante la inyección de morfolinós en los primeros estadios del desarrollo, esperando detectar alguna alteración morfológica o fisiológica en el pez de manera similar a las alteraciones fenotípicas que ocurren en humanos. Sin embargo, los resultados tras la inyección de varios morfolinós fueron inespecíficos (realizado por el Dr. Alejandro Barrallo).

Paralelamente, el grupo intentó la estrategia de conseguir un pez cebra mutante para MLC1 usando la técnica de *TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes)* mediante los servicios *Zebrafish Tilling Project* dirigido por el centro de investigación Fred Hutchinson. Ahora mismo disponemos de dos líneas de peces mutantes, los cuales se están cruzando para conseguir segregarse el fenotipo observado con la mutación en zMLC1 y no debido a la mutación en algún otro gen. Sin embargo, se han conseguido obtener varios peces adultos provistos de una de las mutaciones en homocigosis. A pesar de no haber sido capaces de observarles un fenotipo de enfermedad, quisimos estudiar si pasaba lo mismo en dichos peces que lo que pasaba en los pacientes, que cuando presentan una mutación, lo que se observa es que la proteína no se detecta (Duarri et al., 2008), (Lopez-Hernandez et al., 2011b). Lo que pudimos observar fue que pasaba exactamente lo mismo que en humanos, que en los peces portadores de la mutación I80R en homocigosis, la proteína no se expresaba, tanto en cerebro como en ojos. En cambio, sí se expresaba en peces controles y en peces donde la mutación se encontraba en heterocigosis (Figura 119). Podíamos decir entonces que teníamos ahora un modelo de pez mutante para zMLC1.





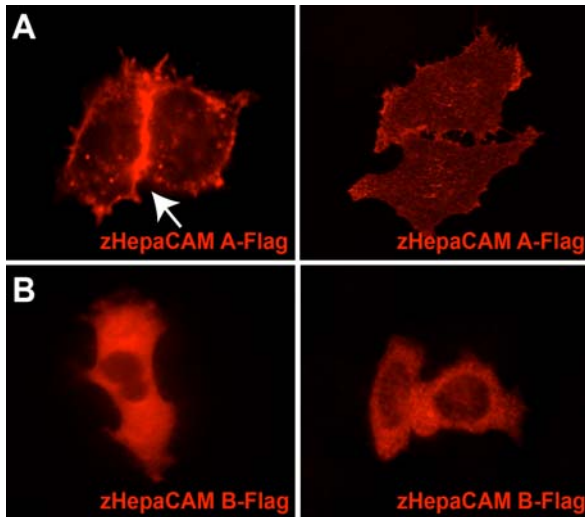
**Figura 119: El pez mutante con la mutación de MLC1 I80R en homocigosis resulta en una pérdida total de la proteína zMLC1.** Extractos de homogenados de cerebro y ojos de peces control, heterocigotos y homocigotos para la mutación I80R de MLC1 fueron analizados por Western blot (dilución de anti-zMLC1 1:100). Puede observarse la pérdida de expresión de la proteína zMLC1 (en la banda de 37 KDa) en el caso de los peces homocigotos, tanto en cerebro como en ojos. Como control de carga se usó el anticuerpo contra la tubulina acetilada (banda de 55 KDa).

## 5. GLIALCAM EN EL PEZ CEBRA.

Por otro lado, debido al descubrimiento de *GLIALCAM* como segundo gen de MLC, también se procedió al clonaje del gen ortólogo de pez cebra (zHepaCAM) para también implementar el modelo de MLC en el pez. Cabe destacar que la realización de un análisis informático realizado por el Dr. Alejandro Barrallo mostró la presencia de dos miembros de GlialCAM ortólogos en el pez: zHepaCAM A y zHepaCAM B, los cuales ambos fueron clonados fusionándoles tres epítomos Flag para poderlos detectar, ya que no disponíamos de anticuerpos.

El primer experimento que llevamos a cabo tras clonar ambas construcciones fue el de observar si ambas proteínas tenían un comportamiento similar al de la proteína humana en células HeLa transfectadas. Lo que pudimos observar fue que la variante zHepaCAM A se expresaba mucho mejor que la variante zHepaCAM B, y además su

localización era bien en la membrana plasmática, bien en las uniones célula-célula, mientras que la variante B presentaba un marcaje difuso intracelular y en ningún caso llegaba a la membrana plasmática (Figura 120).

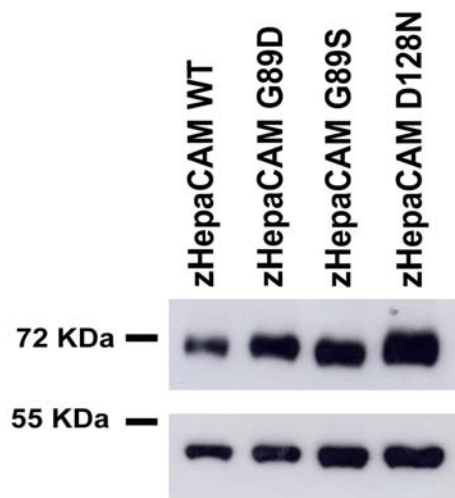


**Figura 120: Localización de zHepaCAM A y zHepaCAM B en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra zGlialCAM). **(A)** Puede observarse que zHepaCAM A es capaz de alcanzar los contactos célula-célula o localizarse alrededor de la membrana plasmática. **(B)** En cambio, zHepaCAM B se queda retenido intracelularmente y no es capaz de llegar a las uniones celulares ni a la membrana plasmática. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula.

El siguiente paso fue clonar algunas de las mutaciones dominantes de *GLIALCAM* presentes en pacientes de MLC ortólogas en el pez cebra: las variantes zG89D, zG89S y zD128N (se clonaron usando como molde la variante zHepaCAM A puesto que tenía un comportamiento más parecido al de la proteína humana). Se llevó a cabo el mismo tipo de estudios bioquímicos que se realizaron en células HeLa con la proteína humana, estudiando si el tráfico de zHepaCAM y sus variantes mutantes afectaban a zMLC1 o a una de las 3 isoformas del gen *CIC-2* del pez cebra (zCIC-2 B), el cual también fue clonado. Para zHepaCAM y para zCIC-2 no se realizaron anticuerpos. Por ello, se clonaron insertándoles 3 epítipos Flag en la parte C terminal de cada una de ellas. Sin embargo, para estudiar lo que ocurría entre zGlialCAM y zCIC-2, se procedió a otro clonaje, que era la inserción de la esmeralda GFP en la parte C-terminal de zHepaCAM.

Con las variantes dominantes clonadas quisimos estudiar si estas mutaciones provocaban algún efecto en el pez, si actuaban como dominantes negativos. Para ello, debíamos hacer RNA mensajero *in vitro* de cada una de ellas e inyectarlos en el pez. Lo probamos, pero no vimos ningún efecto claro, con lo que se pospuso hacer nuevos experimentos hasta saber más acerca de la localización de zHepaCAM en el pez cebra, así como saber qué fenotipo pudiera ser el que esperaríamos.

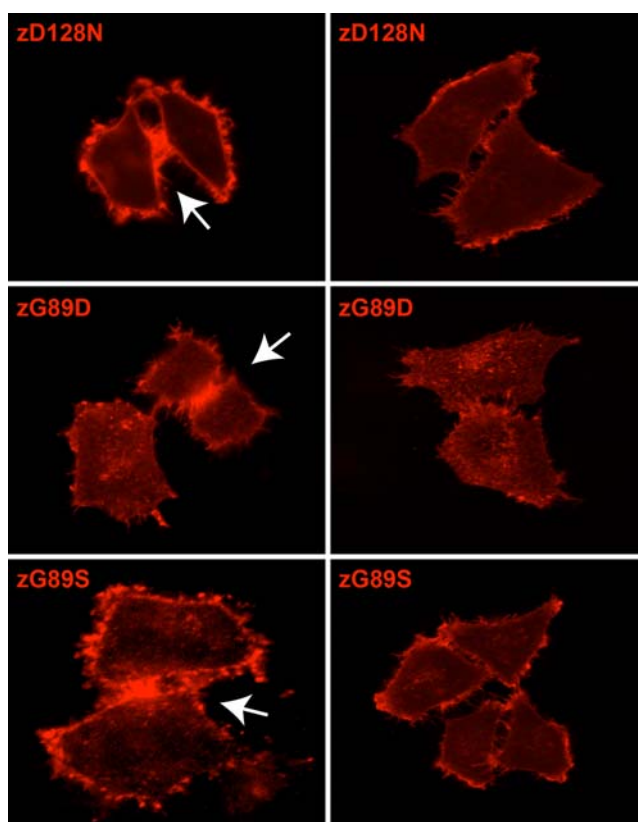
No obstante, tras clonar las mutaciones, lo primero que hicimos fue testar su expresión por Western blot. Como puede verse en la Figura 128, las variantes dominantes de zHepaCAM se expresan de manera similar a la proteína salvaje (igual que en el caso de las variantes de la proteína humana).



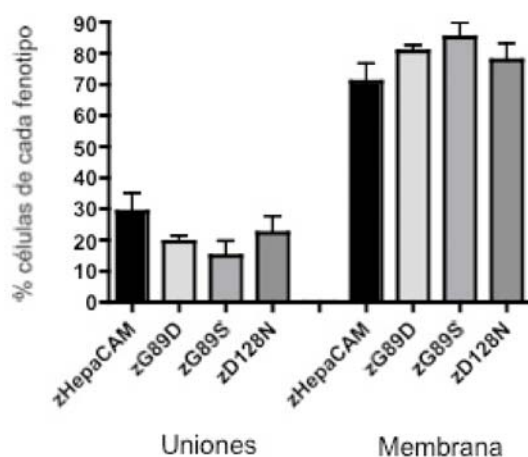
**Figura 121: Nivel de expresión de las proteínas que portan mutaciones dominantes en zHepaCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con las construcciones correspondientes y tras 48 horas se realizaron extractos proteicos que fueron analizados por WB. Se observa un nivel similar de expresión respecto a la proteína zHepaCAM salvaje (zHepaCAM se observa en la banda de 72KDa). Control de carga realizado con anti  $\beta$  actina (se observa en el panel donde el marcador señala 55 KDa). N=2

De igual manera, se estudiaron dichas variantes por inmunofluorescencia. Se observó que tanto la proteína salvaje como las variantes mutantes estudiadas eran capaces de alcanzar las uniones célula-célula. Sin embargo, era mayor el porcentaje de células donde la proteína se localizaba preferentemente en la membrana plasmática (un 29,1 + 6,1% en uniones frente a un 70,8 + 6,1% en la membrana) (Figura 122). Una posible explicación que

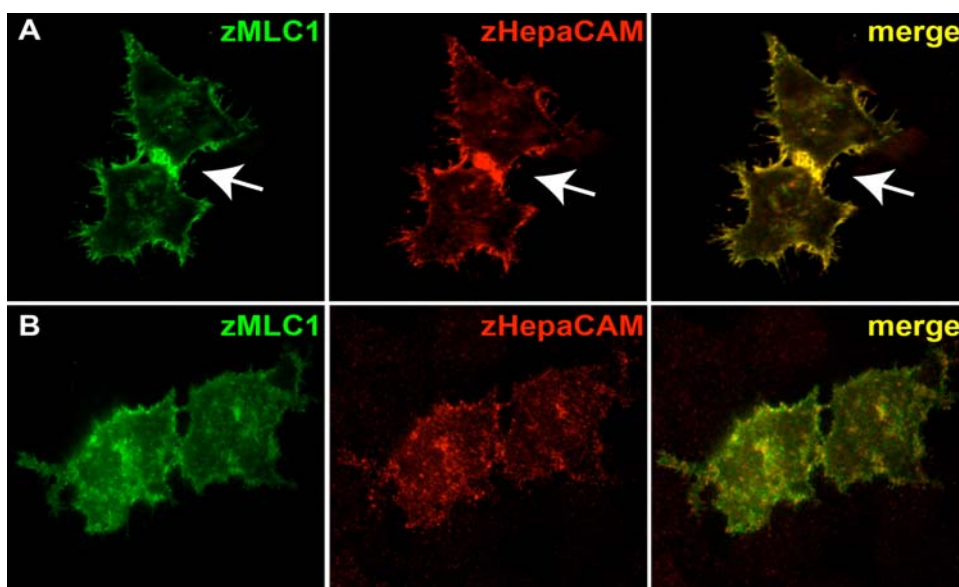
hace que esta localización sea diferente a lo encontrado con la proteína humana es que el vector en el cual tales construcciones están clonadas es un pCSDest, puesto que el objetivo principal era hacer cRNA para inyectarlo en el pez. Sabemos que este vector no expresa niveles tan altos de proteína como el vector pCDNA3 para expresión en células de mamíferos. En el caso de los estudios de GlialCAM humano y todas las variantes mutadas están clonadas en el vector pCDNA3.



**Figura 122: Localización de las variantes dominantes de zHepaCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes que portan las mutaciones dominantes seleccionadas causantes de MLC. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra zGlialCAM). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 4-10 experimentos independientes. (zHepaCAM: N=10, 554 células. G89D: N=5, 322 células. G89S: N=4, 192 células. D128N: N=4, 232 células). Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni comparando la localización de la proteína salvaje frente a las variantes mutadas. No se observaron diferencias significativas.



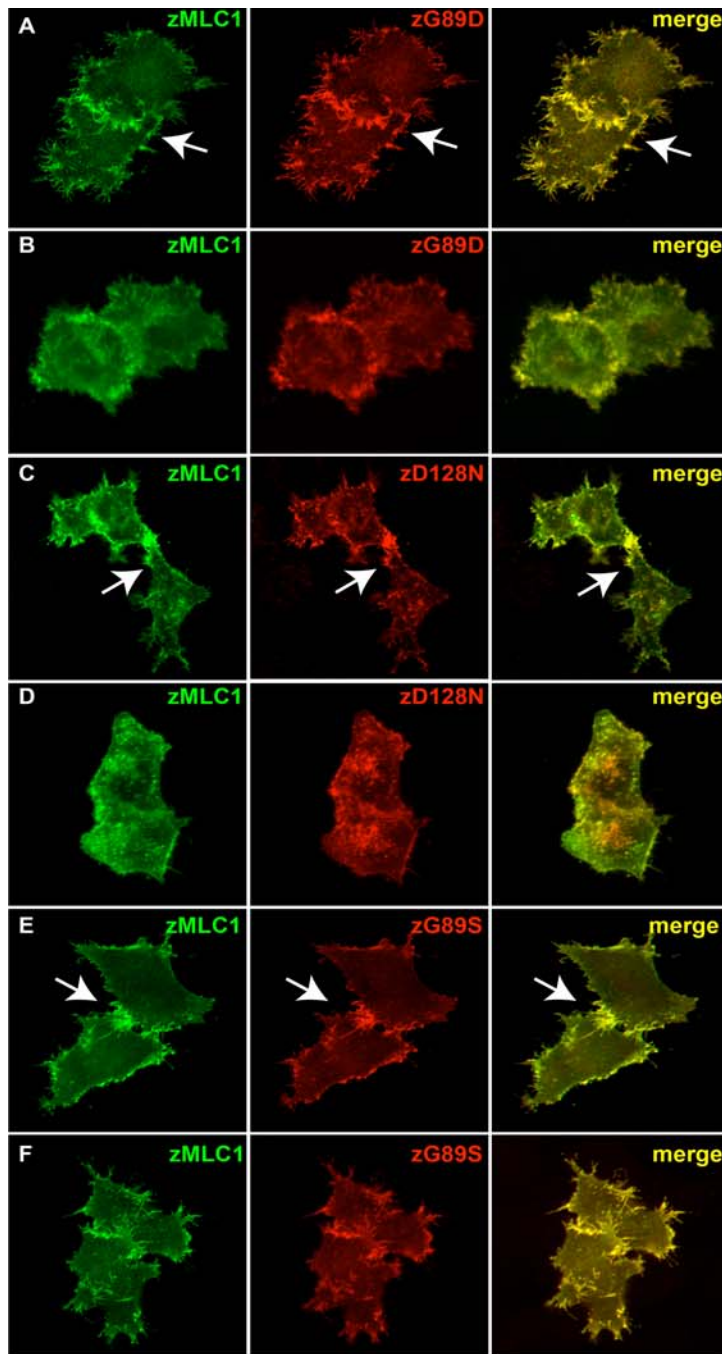
El siguiente experimento que se llevó a cabo fue estudiar si zHepaCAM era capaz de dirigir a zMLC1 a los contactos célula-célula, como lo hacía la proteína humana. Pudimos observar que la proteína zHepaCAM también era capaz de actuar como molécula escolta con la proteína zMLC1, dirigiéndola a las uniones celulares (Figura 123). Sin embargo, igual que antes, era mayor el porcentaje de células donde zMLC1 se localizaba en la membrana (Figura 130).



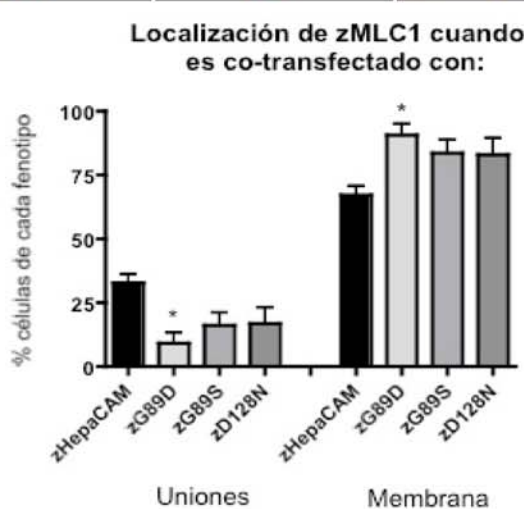
**Figura 123: zMLC1 sigue a zHepaCAM a las uniones célula-célula.** Células HeLa fueron co-transfectadas con zMLC1 y zHepaCAM (con 3 epítomos Flag). **(A)** Puede verse a zMLC1 concentrada en el contacto entre las dos células, donde ambas proteínas co-localizan. **(B)** En este caso, tanto zMLC1 como zHepaCAM se localizaban en la membrana plasmática. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra zMLC1 y un anticuerpo monoclonal contra el epítomo Flag (contra zHepaCAM). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus* y corresponden a imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

De igual manera que con la proteína humana, se estudió si la presencia de las mutaciones dominantes en zHepaCAM influenciaba en la localización de zMLC1. Tras el análisis de pares de células en una media de 4 a 6 experimentos independientes, no se observa una afectación significativa en dicha localización en comparación con la proteína zHepaCAM salvaje (sólo en el caso de la variante G89D) (Figura 124).

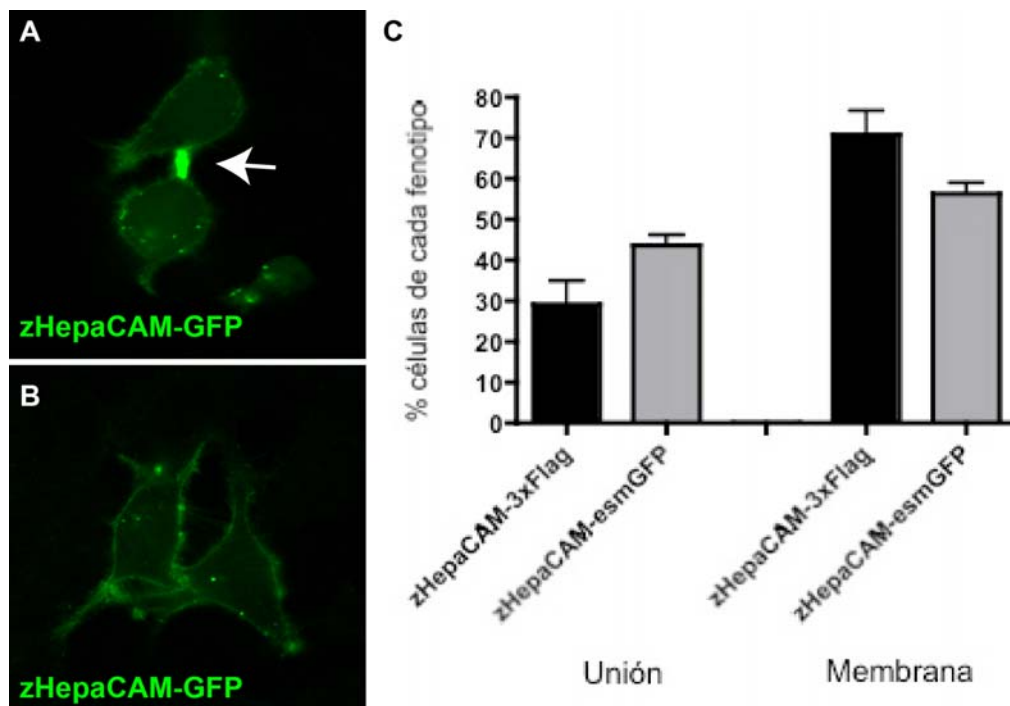




**Figura 124: zMLC1 sigue la localización de las variantes de zHepaCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con zMLC1 y con los plásmidos correspondientes que portan las mutaciones dominantes G89D (A-B), G89S (C-D) y D128N (E-F) en zHepaCAM. Las células fueron fijadas y permeabilizadas y se hicieron inmunofluorescencias usando un anticuerpo policlonal contra zMLC1 (en verde) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag, contra zHepaCAM (en rojo). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. Las flechas indican los contactos célula-célula. Puede observarse que hay células donde la variante mutante es capaz de llevar a zMLC1 a las uniones (en A, C y E) o bien, se queda alrededor de la membrana plasmática (en B, D y F). (G) Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 4-6 experimentos independientes. zMLC1+zHepaCAM: 82 células; N=4. zMLC1+zG89D: 114 células; N=5. zMLC1+zG89S: 109 células, N=6. zMLC1+zD128N: 122 células, N=5. Se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni comparando la localización de zMLC1 cuando era co-transfectado con la proteína salvaje frente a cuando lo era con las variantes mutadas. \*p<0,05.

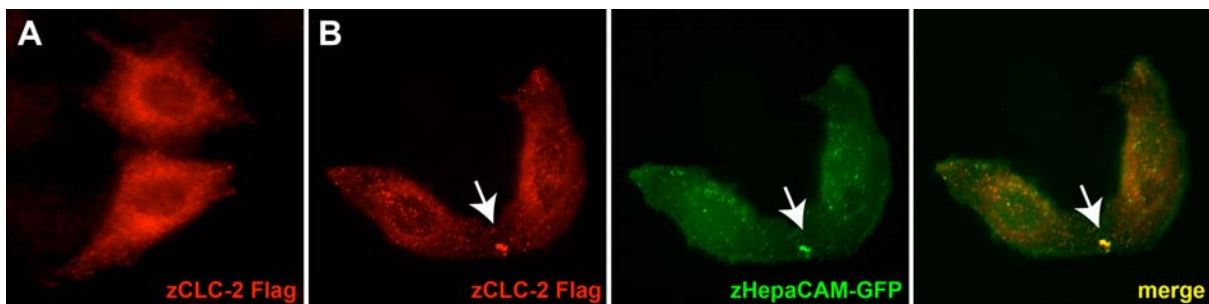


El siguiente paso fue estudiar si zHepaCAM afectaba a la localización de zCIC-2 en células HeLa. Para ello fue necesario clonar tanto zCIC-2 al cual se le fusionaron 3 epítotos Flag en su extremo C-terminal, como clonar a zHepaCAM fusionándole una esmeralda GFP en su extremo C-terminal. Lo primero que se hizo fue estudiar si la fusión de la proteína GFP afectaba a la localización de zHepaCAM en células HeLa. Lo que pudimos observar fue que no, que la proteína era capaz de concentrarse en las uniones, y de hecho, en mayor medida de cómo lo hacía zHepaCAM cuando se le habían fusionado los 3 epítotos Flag (Figura 125), aunque la diferencia no es significativa.



**Figura 125: Localización de zHepaCAM-GFP en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con zHepaCAM-GFP y tras 48 horas las células fueron fijadas. Se adquirieron imágenes en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. En **A** puede observarse que zHepaCAM se concentra en el contacto entre las dos células (lo indica la flecha). En cambio en **B**, zHepaCAM se localiza alrededor de toda la membrana plasmática. **(C)** Pares de células fueron analizadas manualmente y cuantificadas según el criterio de si la proteína se concentraba en uniones o se localizaba alrededor de la membrana plasmática (se usaba el perfil de intensidad de fluorescencia del programa Image J para discernir dichas localizaciones). Los datos representan la media entre 3-10 experimentos independientes. (zHepaCAM-3xFlag: N=10, 554 células. zHepaCAM-GFP: N=3, 194 células). Se usó t Student para comparar la localización en uniones o en membrana de zHepaCAM-3xFlag versus zHepaCAM-GFP. No se observaron diferencias significativas.

Cuando estudiamos la localización de zCIC-2 en células HeLa pudimos ver que presentaba un bajo nivel de transfección y en la mayoría de las células se expresaba de manera difusa en el interior celular, casi no pudiendo detectar si llegaba a la membrana plasmática (Figura 126 A). En cambio, cuando co-expresábamos zCIC-2 con zHepaCAM pudimos observar que zCIC-2 era capaz de localizarse específicamente en el contacto entre dos células (Figura 126 B).



**Figura 126: Comportamiento de zCIC-2 en presencia de zHepaCAM en células HeLa.** Células HeLa fueron transfectadas con zCIC-2 Flag solamente (**A**) o con zCIC-2 y zHepaCAM-GFP (**B**). Tras 48 horas las células fueron fijadas y se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo Flag (contra zCIC-2). Se adquirieron imágenes en un microscopio confocal con *spinning disk DSU Olympus*. zHepaCAM se visualizaba en el filtro de GFP. La colocalización entre ambas proteínas se muestra en amarillo (merge). Las flechas indican los contactos célula-célula. (**A**) Puede observarse que zCIC-2 cuando es transfectado solo tiene un marcaje mayoritariamente difuso intracelular. (**B**) Cuando zCIC-2 es co-transfectado con zHepaCAM, puede observarse que zCIC-2 es capaz de localizarse en el contacto entre las dos células, aunque también haya parte retenido intracelularmente.

Sin embargo, en esta ocasión no se ha procedido a cuantificar el porcentaje de células en que zCIC2 es capaz de concentrarse en las uniones celulares, por lo que es un resultado más bien cualitativo. Asimismo, tampoco se ha podido valorar cómo afectan las variantes con las mutaciones en zHepaCAM a la localización de zCIC2, puesto que para ello debíamos de clonaras fusionándoles la proteína GFP. Sería también interesante medir si zCIC-2 y zHepaCAM son funcionales en oocitos de *Xenopus*.



## 6. DISCUSIÓN.

Los resultados anteriores parecían indicar que existía un marcaje específico en zonas concretas del pez a estadio embrionarios. Sin embargo, el no poder detectar la proteína por WB en dichos estadios y no haber podido obtener el mismo patrón de expresión mediante hibridación *in-situ* ha hecho que no estemos seguros del marcaje obtenido con nuestro anticuerpo durante el desarrollo embrionario. No obstante, el anticuerpo sí era capaz de detectar la proteína zMLC1 en estadios adultos, siendo predominante la expresión en el cerebro, como ya ocurría en el ratón y en humanos. Asimismo, el anticuerpo era capaz de detectar la proteína zMLC1 en células transfectadas, lo cual nos permitía disponer de un control interno en nuestros experimentos.

Por otro lado, en el intento de conseguir un modelo de MLC en el pez, nos encontramos con la inespecificidad debida al uso de los morfolinós, con lo que se pusieron todos los esfuerzos en intentar obtener un pez mutante mediante la técnica de *TILLING*, con la gran suerte de haber encontrado dos peces mutantes. Tras varios años, se ha conseguido un pez modelo de enfermedad, puesto que carece de la expresión de la proteína (como pasa en el caso de los pacientes afectados, que presentan la mutación en *MLC1* y no presentan expresión de la proteína). Ahora se están iniciando estudios para conseguir observar un fenotipo en el pez y elaborar estrategias futuras, como estudios de comportamiento, así como la realización de *screenings* de fármacos.

El hecho de haber descubierto el segundo gen implicado en la enfermedad ha abierto nuevas vías de estudio en el pez para desarrollar un modelo de MLC. Además, que *GLIALCAM* presente mutaciones dominantes es

interesante porque podrían desarrollarse estudios de dominancia negativa, abriendo el abanico de estudios a desarrollar. Lo que hemos observado a nivel bioquímico es que existe una tendencia similar a lo que hemos observado con la proteína GlialCAM humana. Sin embargo, los resultados no son equivalentes, pues el vector de expresión usado es otro y puede ser que por eso hayamos obtenido un menor nivel de expresión en las células HeLa. Aún así cabe destacar que a nivel cualitativo zHepaCAM es capaz de concentrar a zMLC1 y a zCLC2 en las uniones célula-célula en dichas células. Lo más interesante sería poder inyectar RNA mensajero de las variantes que portan las mutaciones dominantes y poder observar algún fenotipo. Sin embargo, fracasamos cuando intentamos hacerlo, puesto que no observamos ningún fenotipo claro. Además, en el momento de hacerlo tampoco sabíamos qué efecto esperábamos ya que aún no se había realizado un patrón de expresión en el pez para determinar dónde se estaba expresando zHepaCAM. Es por ello que sería de gran utilidad disponer de animales transgénicos. Este proyecto se está desarrollando hoy en día en el grupo bajo la dirección del Dr. Alejandro Barrallo.

Como conclusión se puede decir que en esta Tesis se han dado los primeros pasos para desarrollar modelos de MLC en el pez cebra, los cuales esperamos sean claves para nuestro grupo en el futuro próximo.



# **DISCUSIÓN FINAL**

*De la escuela de guerra de la vida.- Lo que no me mata me  
hace más fuerte.*

*Nietzsche*



Durante esta Tesis se ha obtenido información que ha permitido avanzar y ampliar los conocimientos actuales de la Leucoencefalopatía Megalencefálica con quistes subcorticales en diferentes niveles.

El estudio de algunas mutaciones descritas en el gen *MLC1* ha revelado que éstas presentan un tráfico intracelular alterado, provocado seguramente por un defecto en el plegamiento de la proteína. En los pacientes de MLC esto se traduce en una ausencia total de la proteína. Sin embargo, no se ha podido esclarecer una relación genotipo-fenotipo.

Por otra parte, la identificación y análisis del interactoma de MLC1 nos ha permitido encontrar a *GLIALCAM* como el segundo gen implicado en la enfermedad. Esto ha sido un gran avance, ya que ha permitido explicar la enfermedad en ese 25% de pacientes que no tenían mutaciones en *MLC1*. Asimismo, en este estudio también se ha podido determinar que mutaciones dominantes en *GLIALCAM* pueden además causar otras enfermedades como la macrocefalia familiar benigna y la macrocefalia con retraso mental, con o sin autismo.

Estudios bioquímicos centrados en estudiar la relación entre MLC1 y GlialCAM nos han permitido avanzar en el posible mecanismo que causa la enfermedad. Así se ha demostrado que GlialCAM actúa como una molécula escolta, necesaria para localizar específicamente a MLC1 en las uniones celulares. Así, pudimos descubrir que las mutaciones en *GLIALCAM* provocaban un defecto en el tráfico de la proteína debido a una deficiente oligomerización. Como consecuencia, estas mutaciones provocan la deslocalización de los complejos de MLC1-GlialCAM en las uniones astrocitarias. De forma interesante, GlialCAM permite estabilizar a proteínas

defectivas en *MLC1*, pudiendo sugerir nuevas aproximaciones terapéuticas para los pacientes afectados con MLC. Asimismo, hemos encontrado que GlialCAM está interaccionando directa y funcionalmente con el canal de  $\text{Cl}^-$  CIC-2, y que las mutaciones en *GLIALCAM* provocan también un defecto en la concentración de CIC-2 en las uniones entre astrocitos.

Esto sugiere que la función que estas proteínas hacen en las uniones astrocitarias en los pies terminales rodeando los vasos sanguíneos pueda ser clave; y que por eso, defectos en su localización den lugar a la enfermedad. La vacuolización observada en pacientes de MLC con mutaciones en *GLIALCAM* podrían ser debidas a defectos en las propiedades intrínsecas de GlialCAM como molécula de adhesión; a fallos en la señalización por el dominio citoplasmático como ocurre en las cadherinas, pudiendo ser que la función de GlialCAM por sí misma se vea alterada o bien se vean alteradas otras funciones celulares de manera indirecta. También es posible que GlialCAM pueda estar involucrada en agrupar otras proteínas en las uniones entre astrocitos en los pies terminales astrocitarios, y que este agrupamiento macromolecular sea necesario para una correcta señalización intracelular que desemboque en una correcta fisiología astrocitaria.

El problema es que desconocemos la función para estas proteínas. Recientemente se ha correlacionado la falta de *MLC1* con un defecto en la regulación del volumen celular que podría estar mediada por el canal de  $\text{Cl}^-$  regulado por volumen VRAC (Ridder et al., 2011). Sin embargo, la actividad VRAC es distinta de la de CIC-2 (Jordt and Jentsch, 1997). Además, el mecanismo por el cual *MLC1* modula VRAC sigue sin estar claro. Dado que *MLC1* y CIC-2 comparten a GlialCAM como subunidad, no podemos excluir

que MLC1 pueda regular la función de CIC-2 de alguna manera. Sería interesante estudiar si la función de CIC-2 está alterada en células desprovistas de MLC1. Hasta ahora no hemos podido demostrar una interacción directa entre estas dos proteínas (solo ha sido positiva por el método de *split-TEV* y en una conformación posible). Se requiere de más trabajo y más experimentos para terminar de probar si existe una relación directa entre ellas. Tiene sentido pensar que sí existe una relación directa entre MLC1, GlialCAM y CIC-2. Es posible que este complejo ternario se forme solo bajo algunas circunstancias, como por ejemplo una elevada actividad neuronal. MLC1 puede estar actuando como un sensor, activándose en alguna situación que haga que de alguna manera GlialCAM se asocie con CIC-2 y modifique sus propiedades de canal solo en esas circunstancias. La prueba que involucre a CIC2 en la patología MLC requiere aún de otros muchos estudios.

El descubrimiento por tanto de GlialCAM como de CIC-2 nos ha abierto nuevas posibilidades para conseguir llegar a entender el mecanismo patofisiológico de MLC, así como ha permitido abrir nuevas vías de investigación al grupo, como por ejemplo en el campo de las moléculas de adhesión así como en la regulación del transporte de  $\text{Cl}^-$  en las células gliales.





# **CONCLUSIONES**

*La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante y valga la pena.*



**CONCLUSIONES.**

1. La vía de degradación del proteasoma asociada al retículo endoplasmático así como la asociada al compartimento endolisosomal contribuyen a la degradación de las proteínas que portan mutaciones encontradas en *MLC1*.
2. Mediante técnicas proteómicas se ha identificado a GlialCAM como una proteína que interacciona con MLC1. GlialCAM es necesaria para dirigir el tráfico de MLC1 a las uniones célula-célula. *GLIALCAM* es el segundo gen implicado en MLC. Además, mutaciones dominantes de *GLIALCAM* causan macrocefalia familiar benigna y la macrocefalia con retraso mental, con o sin autismo.
3. GlialCAM también funciona como una subunidad accesoria del canal de Cl<sup>-</sup> CIC-2. GlialCAM localiza a CIC-2 en contactos célula-célula y modifica las propiedades funcionales de CIC-2.
4. La mayoría de las mutaciones de MLC en *GLIALCAM* provocan un defecto en su homo-oligomerización y en el tráfico a uniones celulares. Por ello, estas mutaciones también afectan al tráfico de MLC1 y CIC-2. Sin embargo, las mutaciones no influyen en la hetero-oligomerización ni en la activación funcional de CIC-2. El dominio C-terminal de GlialCAM puede ser importante para la localización en uniones celulares.

5. Se han obtenido las primeras herramientas para poder desarrollar diferentes modelos de la enfermedad MLC en el pez cebra.

# **BIBLIOGRAFÍA**

*La vida consiste en  
la comprensión de la verdad.*

*Leon Tolstoi*



**BIBLIOGRAFÍA**

Abrams, C. K. and Scherer, S. S. (2011). Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*.

Almgren, M., Nyengaard, J. R., Persson, B. and Lavebratt, C. (2008). Carbamazepine protects against neuronal hyperplasia and abnormal gene expression in the megalencephaly mouse. *Neurobiol Dis* 32, 364-76.

Alwine, J. C. (1985). Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Mol Cell Biol* 5, 1034-42.

Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T. C. and Aloisi, F. (2008). Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Mol Cell Neurosci* 37, 480-93.

Amedee, T., Robert, A. and Coles, J. A. (1997). Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia* 21, 46-55.

Ballanyi, K., Grafe, P., Serve, G. and Schlue, W. R. (1990). Electrophysiological measurements of volume changes in leech neuropile glial cells. *Glia* 3, 151-8.

Baorto, D. M., Mellado, W. and Shelanski, M. L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J Cell Biol* 117, 357-67.

Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15, 525-30.

Beaudoin, G. M., 3rd. (2006). Con-nectin axons and dendrites. *J Cell Biol* 174, 7-9.

Becker, D., Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M. (2009). Functional interaction of the cation channel transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and actin in volume regulation. *Eur J Cell Biol* 88, 141-52.

Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M. (2005). TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci* 118, 2435-40.

Becker, M., Matzner, M. and Gerisch, G. (1999). Drainin required for membrane fusion of the contractile vacuole in Dictyostelium is the prototype of a protein family also represented in man. *EMBO J* 18, 3305-16.

Ben-Zeev, B., Levy-Nissenbaum, E., Lahat, H., Anikster, Y., Shinar, Y., Brand, N., Gross-Tzur, V., MacGregor, D., Sidi, R., Kleta, R. et al. (2002). Megalencephalic leukoencephalopathy with



subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews. *Hum Genet* 111, 214-8.

Benarroch, E. E. (2005). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 80, 1326-38.

Benesova, J., Hock, M., Butenko, O., Prajerova, I., Anderova, M. and Chvatal, A. (2009). Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice. *J Neurosci Res* 87, 96-111.

Benfenati, V., Caprini, M., Dovizio, M., Mylonakou, M. N., Ferroni, S., Ottersen, O. P. and Amiry-Moghaddam, M. (2011). An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2563-8.

Benfenati, V. and Ferroni, S. (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168, 926-40.

Benfenati, V., Nicchia, G. P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A. and Ferroni, S. (2007). Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 100, 87-104.

Bernard, P. and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735-45.

Bettecken, T., Rubie, C., Lichtner, P., Siekiera, M., Meitinger, T. and Stober, G. (2002). Reduced amplification efficiency of KIAA0027/MLC1 alleles: implications for the molecular diagnosis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Mol Cell Probes* 16, 379-84.

Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N. and Shaw, P. J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 57, 1251-64.

Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hubner, C. A. and Jentsch, T. J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel CIC-2. *J Neurosci* 27, 6581-9.

Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P. A., Hanefeld, F. A., Van Der Knaap, M. S. and Kohler, W. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics* 34, 215-8.

Bodoy, S., Martin, L., Zorzano, A., Palacin, M., Estevez, R. and Bertran, J. (2005). Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J Biol Chem* 280, 12002-11.

Boer, K., Spliet, W. G., van Rijen, P. C., Jansen, F. E. and Aronica, E. (2010). Expression patterns of AMOG in developing human cortex and malformations of cortical development. *Epilepsy Res* 91, 84-93.

Bonuccelli, G., Sotgia, F., Capozza, F., Gazzo, E., Minetti, C. and Lisanti, M. P. (2007). Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell Cycle* 6, 1242-8.

Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J. C., van Horsen, J., Dinopoulos, A., Bove, K. E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F. et al. (2007). MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol* 114, 403-10.

Boor, P. K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C. B., Powers, J. M., Pronk, J. C., Scheper, G. C. and van der Knaap, M. S. (2005). MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 412-9.

Bosl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F. and Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption. *EMBO J* 20, 1289-99.

Brignone, M. S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T. C. and Ambrosini, E. (2011). The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: new insights into MLC pathogenesis. *Hum Mol Genet* 20, 90-103.

Brockmann, K., Finsterbusch, J., Terwey, B., Frahm, J. and Hanefeld, F. (2003). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in an adult: quantitative proton MR spectroscopy and diffusion tensor MRI. *Neuroradiology* 45, 137-42.

Brosamle, C. and Halpern, M. E. (2002). Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39, 47-57.

Brummendorf, T. and Rathjen, F. G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6, 584-93.

Bugiani, M., Moroni, I., Bizzi, A., Nardocci, N., Bettecken, T., Gartner, J. and Uziel, G. (2003). Consciousness disturbances in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Neuropediatrics* 34, 211-4.

Butt, A. M. and Kalsi, A. (2006). Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 10, 33-44.

Butt, A. M. and Ransom, B. R. (1989). Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia* 2, 470-5.

Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., Agnati, L., Ferre, S., Bouvier, M., Fuxe, K. et al. (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* 88, 726-34.

Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S. et al. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 278, 46741-9.

Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S. and Rougon, G. (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J* 21, 6348-57.

Chen, J., Bernreuther, C., Dihne, M. and Schachner, M. (2005). Cell adhesion molecule I1-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 22, 896-906.

Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K. D. and Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci* 30, 15769-77.

Chung Moh, M., Hoon Lee, L. and Shen, S. (2005). Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42, 833-41.

Ciruela, F. (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol* 19, 338-43.

Clayton, G. H., Staley, K. J., Wilcox, C. L., Owens, G. C. and Smith, R. L. (1998). Developmental expression of C1C-2 in the rat nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 108, 307-18.

Coles, J. A., Orkand, R. K. and Yamate, C. L. (1989). Chloride enters glial cells and photoreceptors in response to light stimulation in the retina of the honey bee drone. *Glia* 2, 287-97.

Coman, I., Barbin, G., Charles, P., Zalc, B. and Lubetzki, C. (2005). Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J Neurol Sci* 233, 67-71.

Cornejo, I., Niemeyer, M. I., Zuniga, L., Yusef, Y. R., Sepulveda, F. V. and Cid, L. P. (2009). Rapid recycling of CIC-2 chloride channels between plasma membrane and endosomes: role of a tyrosine endocytosis motif in surface retrieval. *J Cell Physiol* 221, 650-7.

Cortez, M. A., Li, C., Whitehead, S. N., Dhani, S. U., D'Antonio, C., Huan, L. J., Bennett, S. A., Snead, O. C., 3rd and Bear, C. E. (2010). Disruption of CIC-2 expression is associated with progressive neurodegeneration in aging mice. *Neuroscience* 167, 154-62.

Cusick, M. E., Klitgord, N., Vidal, M. and Hill, D. E. (2005). Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2, R171-81.

Decher, N., Lang, H. J., Nilius, B., Bruggemann, A., Busch, A. E. and Steinmeyer, K. (2001). DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134, 1467-79.

Deissler, H., Kuhn, E. M. and Lang, G. E. (2007). Tetraspanin CD9 is involved in the migration of retinal microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 20, 643-52.

Demyanenko, G. P., Riday, T. T., Tran, T. S., Dalal, J., Darnell, E. P., Brennaman, L. H., Sakurai, T., Grumet, M., Philpot, B. D. and Maness, P. F. (2011). NrCAM deletion causes topographic mistargeting of thalamocortical axons to the visual cortex and disrupts visual acuity. *J Neurosci* 31, 1545-58.

Devaney, J. M., Donarum, E. A., Brown, K. M., Meyer, J., Stober, G., Lesch, K. P., Nestadt, G., Stephan, D. A. and Pulver, A. E. (2002). No missense mutation of WKL1 in a subgroup of probands with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7, 419-23.

Dhani, S. U., Kim Chiaw, P., Huan, L. J. and Bear, C. E. (2008). ATP depletion inhibits the endocytosis of CIC-2. *J Cell Physiol* 214, 273-80.

Dibaj, P., Kaiser, M., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F. and Neusch, C. (2007). Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem* 103, 2620-8.

Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M. C., Montolio, M., Lopez-Hernandez, T., Boor, I., Lien, C. F., Hagemann, T., Messing, A. et al. (2011). Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol Dis* 43, 228-38.

Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G. C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A. et al. (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum Mol Genet* 17, 3728-39.

Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M. K., Suzuki, A., Imhof, B. A. and Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 116, 3879-91.

Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117, 19-29.

Engel, P., Eck, M. J. and Terhorst, C. (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 3, 813-21.

Ernest, N. J., Weaver, A. K., Van Duyn, L. B. and Sontheimer, H. W. (2005). Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C1451-60.

Ewald, H. and Lundorf, M. D. (2002). The missense mutation in the WKL1 gene not found in patients with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 7, 340-1.

Farinha, C. M., Penque, D., Roxo-Rosa, M., Lukacs, G., Dormer, R., McPherson, M., Pereira, M., Bot, A. G., Jorna, H., Willemsen, R. et al. (2004). Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2, 73-7.

Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B. and Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* 56, 633-45.

Feinberg, K., Eshed-Eisenbach, Y., Frechter, S., Amor, V., Salomon, D., Sabanay, H., Dupree, J. L., Grumet, M., Brophy, P. J., Shrager, P. et al. (2010). A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na<sup>+</sup> channels during the formation of nodes of Ranvier. *Neuron* 65, 490-502.

Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M. and Rapisarda, C. (1997). Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia* 21, 217-27.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.

Fischer, G. and Kettenmann, H. (1985). Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. *Exp Cell Res* 159, 273-9.

Foldy, C., Lee, S. H., Morgan, R. J. and Soltesz, I. (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel ClC-2. *Nat Neurosci* 13, 1047-9.

- Garcia-Olivares, J., Alekov, A., Boroumand, M. R., Begemann, B., Hidalgo, P. and Fahlke, C. (2008). Gating of human CIC-2 chloride channels and regulation by carboxy-terminal domains. *J Physiol* 586, 5325-36.
- Gaudry, J. P., Arod, C., Sauvage, C., Busso, S., Dupraz, P., Pankiewicz, R. and Antonsson, B. (2008). Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation. *Protein Expr Purif* 58, 94-102.
- Giaume, C. and Venance, L. (1995). Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect Dev Neurobiol* 2, 335-45.
- Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M. and Schachner, M. (1990). The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 110, 165-74.
- Gorospe, J. R., Singhal, B. S., Kainu, T., Wu, F., Stephan, D., Trent, J., Hoffman, E. P. and Naidu, S. (2004). Indian Agarwal megalencephalic leukodystrophy with cysts is caused by a common MLC1 mutation. *Neurology* 62, 878-82.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grumet, M. (1997). Nr-CAM: a cell adhesion molecule with ligand and receptor functions. *Cell Tissue Res* 290, 423-8.
- Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M. and Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759-62.
- Gu, C. and Gu, Y. (2011). Clustering and activity tuning of Kv1 channels in myelinated hippocampal axons. *J Biol Chem* 286, 25835-47.
- Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B. and 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, 9265-70.
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H. and Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27, 6473-7.
- Haney, C. A., Sahenk, Z., Li, C., Lemmon, V. P., Roder, J. and Trapp, B. D. (1999). Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146, 1173-84.
- He, Y., Jensen, G. J. and Bjorkman, P. J. (2009). Cryo-electron tomography of homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule L1. *Structure* 17, 460-71.

Hinzpeter, A., Lipecka, J., Brouillard, F., Baudoin-Legros, M., Dadlez, M., Edelman, A. and Fritsch, J. (2006). Association between Hsp90 and the CIC-2 chloride channel upregulates channel function. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C45-56.

Jayakumar, A. R. and Norenberg, M. D. (2010). The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 25, 31-8.

Jayakumar, A. R., Panickar, K. S., Curtis, K. M., Tong, X. Y., Moriyama, M. and Norenberg, M. D. (2011). Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of cell swelling in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *J Neurochem* 117, 437-48.

Jentsch, T. J. (2002). Chloride channels are different. *Nature* 415, 276-7.

Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch* 437, 783-95.

Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Müller, C. S., Schulte, U. et al. (2012). GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel auxiliary subunit. *Neuron*.

Jordt, S. E. and Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. *EMBO J* 16, 1582-92.

Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B. and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 125B, 31-7.

Kagawa, T., Mekada, E., Shishido, Y. and Ikenaka, K. (1997). Immune system-related CD9 is expressed in mouse central nervous system myelin at a very late stage of myelination. *J Neurosci Res* 50, 312-20.

Kahle, K. T., Simard, J. M., Staley, K. J., Nahed, B. V., Jones, P. S. and Sun, D. (2009). Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 24, 257-65.

Keiper, T., Santoso, S., Nawroth, P. P., Orlova, V. and Chavakis, T. (2005). The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions. *Histol Histopathol* 20, 197-203.

Kenrick, S., Watkins, A. and De Angelis, E. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-86.

Kerppola, T. K. (2006a). Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat Methods* 3, 969-71.

Kerppola, T. K. (2006b). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 1, 1278-86.

Kerppola, T. K. (2006c). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 449-56.

Kerppola, T. K. (2008a). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37, 465-87.

Kerppola, T. K. (2008b). Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol* 85, 431-70.

Kim, S. B., Sato, M. and Tao, H. (2009). Split Gaussia luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells. *Anal Chem* 81, 67-74.

Kimelberg, H. K. (2004a). Increased release of excitatory amino acids by the actions of ATP and peroxynitrite on volume-regulated anion channels (VRACs) in astrocytes. *Neurochem Int* 45, 511-9.

Kimelberg, H. K. (2004b). Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 129, 851-60.

Kimelberg, H. K. (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50, 389-97.

Kimelberg, H. K., Goderie, S. K., Higman, S., Pang, S. and Waniewski, R. A. (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10, 1583-91.

Kimelberg, H. K., Macvicar, B. A. and Sontheimer, H. (2006). Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54, 747-57.

Kiryama, T., Tanizawa, E., Hirano, M., Shinkai, T., Asai, H., Furiya, Y. and Ueno, S. (2007). SPECT revealed cortical dysfunction in a patient who had genetically definite megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Clin Neurol Neurosurg* 109, 526-30.

Kiryushko, D., Berezin, V. and Bock, E. (2004). Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 140-54.

Kleene, R., Yang, H., Kutsche, M. and Schachner, M. (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276, 21656-63.



Kleopa, K. A., Orthmann, J. L., Enriquez, A., Paul, D. L. and Scherer, S. S. (2004). Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47, 346-57.

Kurita, S., Ogita, H. and Takai, Y. (2011). Cooperative role of nectin-nectin and nectin-afadin interactions in formation of nectin-based cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 286, 36297-303.

Labasque, M., Devaux, J. J., Leveque, C. and Faivre-Sarrailh, C. (2011). The fibronectin type III-like domains of neurofascin-186 mediates gliomedin binding and its clustering at the developing nodes of ranvier. *J Biol Chem*.

Labasque, M. and Faivre-Sarrailh, C. (2010). GPI-anchored proteins at the node of Ranvier. *FEBS Lett* 584, 1787-92.

Lanciotti, A., Brignone, M. S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M. et al. (2010). MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 37, 581-95.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58, 913-49.

Leegwater, P. A., Boor, P. K., Pronk, J. C. and van der Knaap, M. S. (2002a). Association of WKL1/MLC1 with catatonic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7, 1037; author reply 1037-8.

Leegwater, P. A., Boor, P. K., Yuan, B. Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A. A., Oudejans, C. B., Schutgens, R. B., Pronk, J. C. and van der Knaap, M. S. (2002b). Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genet* 110, 279-83.

Leegwater, P. A., Yuan, B. Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A. A., Boor, P. K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S. M., Frants, R. R., Oudejans, C. B. et al. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet* 68, 831-8.

Leisle, L., Ludwig, C. F., Wagner, F. A., Jentsch, T. J. and Stauber, T. (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup>-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J* 30, 2140-52.

Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R. and Raine, C. S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607-15.

Lieschke, G. J. and Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353-67.

Liu, H., Focia, P. J. and He, X. (2011). Homophilic adhesion mechanism of neurofascin, a member of the L1 family of neural cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 286, 797-805.

Liu, H. T., Tashmukhamedov, B. A., Inoue, H., Okada, Y. and Sabirov, R. Z. (2006). Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress. *Glia* 54, 343-57.

Lopez-Hernandez, T., Ridder, M. C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V. et al. (2011a). Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet* 88, 422-32.

Lopez-Hernandez, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernandez-Duenas, V., Scheper, G. C., van der Knaap, M. S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I. et al. (2011b). Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genet* 20, 3266-77.

Lorenz, C., Pusch, M. and Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13362-6.

Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J. R. and Alemany, R. (2006). Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther* 13, 696-705.

Makara, J. K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhäuser, C., Spat, A. and Kettenmann, H. (2003). Astrocytes from mouse brain slices express CIC-2-mediated Cl<sup>-</sup> currents regulated during development and after injury. *Mol Cell Neurosci* 23, 521-30.

Malarkey, E. B., Ni, Y. and Parpura, V. (2008). Ca<sup>2+</sup> entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56, 821-35.

Maness, P. F. and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10, 19-26.

Margeta-Mitrovic, M. (2002). Assembly-dependent trafficking assays in the detection of receptor-receptor interactions. *Methods* 27, 311-7.

McCarthy, K. D. and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85, 890-902.

McQuillin, A., Kalsi, G., Moorey, H., Lamb, G., Mayet, S., Quedsted, D., Baker, P., Curtis, D. and Gurling, H. M. (2002). A novel polymorphism in exon 11 of the WKL1 gene, shows no association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet* 10, 491-4.

Menichella, D. M., Goodenough, D. A., Sirkowski, E., Scherer, S. S. and Paul, D. L. (2003). Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci* 23, 5963-73.

Meyer, J., Huberth, A., Ortega, G., Syagailo, Y. V., Jatzke, S., Mossner, R., Strom, T. M., Ulzheimer-Teuber, I., Stober, G., Schmitt, A. et al. (2001). A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol Psychiatry* 6, 302-6.

Mischel, P. S., Shai, R., Shi, T., Horvath, S., Lu, K. V., Choe, G., Seligson, D., Kremen, T. J., Palotie, A., Liao, L. M. et al. (2003). Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* 22, 2361-73.

Mizoguchi, A., Nakanishi, H., Kimura, K., Matsubara, K., Ozaki-Kuroda, K., Katata, T., Honda, T., Kiyohara, Y., Heo, K., Higashi, M. et al. (2002). Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *J Cell Biol* 156, 555-65.

Moghaddam, B. and Adams, R. N. (1987). Regional differences in resting extracellular potassium levels of rat brain. *Brain Res* 406, 337-40.

Moh, M. C., Zhang, C., Luo, C., Lee, L. H. and Shen, S. (2005). Structural and functional analyses of a novel ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells. *J Biol Chem* 280, 27366-74.

Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O. et al. (2006). Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum Mutat* 27, 292.

Morsy, M., Gouthu, S., Orchard, S., Thorneycroft, D., Harper, J. F., Mittler, R. and Cushman, J. C. (2008). Charting plant interactomes: possibilities and challenges. *Trends Plant Sci* 13, 183-91.

Nagai, T., Iyata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20, 87-90.

Nagy, J. I., Dudek, F. E. and Rash, J. E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 191-215.

Nedergaard, M., Ransom, B. and Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523-30.

Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H. V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G. E. and Melvin, J. E. (2002). Loss of hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in salivary acinar cells from *Clcn2* knockout mice. *J Biol Chem* 277, 23604-11.

Neusch, C., Papadopoulos, N., Muller, M., Maletzki, I., Winter, S. M., Hirrlinger, J., Handschuh, M., Bahr, M., Richter, D. W., Kirchhoff, F. et al. (2006). Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K<sup>+</sup> buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K<sup>+</sup> regulation. *J Neurophysiol* 95, 1843-52.

Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R. E., Lester, H. A. and Kofuji, P. (2001). Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21, 5429-38.

Newman, E. A. (1986). High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233, 453-4.

Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, M. R., Seeman, P. and George, S. R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 200-4.

Nicchia, G. P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C. F., Frigeri, A. and Spray, D. C. (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J* 19, 1674-6.

Niemeyer, M. I., Yusef, Y. R., Cornejo, I., Flores, C. A., Sepulveda, F. V. and Cid, L. P. (2004). Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Genomics* 19, 74-83.

Nilius, B. and Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 177, 119-47.

O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. and Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254, 539-44.

Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S. and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29, 547-53.

Ogita, H., Rikitake, Y., Miyoshi, J. and Takai, Y. (2010). Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 621-9.

Pan, Z., Yang, H., Mergler, S., Liu, H., Tachado, S. D., Zhang, F., Kao, W. W., Koziel, H., Pleyer, U. and Reinach, P. S. (2008). Dependence of regulatory volume decrease on transient

receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell Calcium* 44, 374-85.

Panicker, A. K., Buhusi, M., Thelen, K. and Maness, P. F. (2003). Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci* 8, d900-11.

Park, H., Oh, S. J., Han, K. S., Woo, D. H., Mannaioni, G., Traynelis, S. F. and Lee, C. J. (2009). Bestrophin-1 encodes for the Ca<sup>2+</sup>-activated anion channel in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 29, 13063-73.

Pasantes-Morales, H., Cardin, V. and Tuz, K. (2000a). Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res* 25, 1301-14.

Pasantes-Morales, H., Franco, R., Torres-Marquez, M. E., Hernandez-Fonseca, K. and Ortega, A. (2000b). Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 10, 361-70.

Pasantes-Morales, H., Lezama, R. A., Ramos-Mandujano, G. and Tuz, K. L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 119, S4-11.

Pasantes-Morales, H. and Martin del Rio, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. *Prog Clin Biol Res* 351, 317-28.

Pasantes-Morales, H. and Morales Mulia, S. (2000). Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86, 414-27.

Pasantes-Morales, H., Moran, J. and Schousboe, A. (1990). Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3, 427-32.

Pascual-Castroviejo, I., van der Knaap, M. S., Pronk, J. C., Garcia-Segura, J. M., Gutierrez-Molina, M. and 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., Santorelli, F. M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A. et al. (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534-7.

Persson, A. S., Westman, E., Wang, F. H., Khan, F. H., Spenger, C. and Lavebratt, C. (2007). Kv1.1 null mice have enlarged hippocampus and ventral cortex. *BMC Neurosci* 8, 10.

Rash, J. E. (2010). Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168, 982-1008.

Rash, J. E., Duffy, H. S., Dudek, F. E., Bilhartz, B. L., Whalen, L. R. and Yasumura, T. (1997). Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol* 388, 265-92.

Rathjen, F. G. and Rutishauser, U. (1984). Comparison of two cell surface molecules involved in neural cell adhesion. *EMBO J* 3, 461-5.

Ratte, S. and Prescott, S. A. (2011). CIC-2 channels regulate neuronal excitability, not intracellular chloride levels. *J Neurosci* 31, 15838-43.

Remy, I. and Michnick, S. W. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods* 3, 977-9.

Remy, I. and Michnick, S. W. (2007). Application of protein-fragment complementation assays in cell biology. *Biotechniques* 42, 137, 139, 141 passim.

Reynolds, R. and Wilkin, G. P. (1991). Oligodendroglial progenitor cells but not oligodendroglia divide during normal development of the rat cerebellum. *J Neurocytol* 20, 216-24.

Ribeiro Mde, C., Hirt, L., Bogousslavsky, J., Regli, L. and Badaut, J. (2006). Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 83, 1231-40.

Ridder, M. C., Boor, I., Lodder, J. C., Postma, N. L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A. B., Estevez, R., Scheper, G. C., Mansvelter, H. D. et al. (2011). Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain*.

Rinke, I., Artmann, J. and Stein, V. (2010). CIC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30, 4776-86.

Rubie, C., Lichtner, P., Gartner, J., Siekiera, M., Uziel, G., Kohlmann, B., Kohlschutter, A., Meitinger, T., Stober, G. and Bettecken, T. (2003). Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Hum Mutat* 21, 45-52.

Ruiz-Ederra, J., Zhang, H. and Verkman, A. S. (2007). Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J Biol Chem* 282, 21866-72.

Saijo, H., Nakayama, H., Ezo, T., Araki, K., Sone, S., Hamaguchi, H., Suzuki, H., Shiroma, N., Kanazawa, N., Tsujino, S. et al. (2003). A case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der Knaap disease): molecular genetic study. *Brain Dev* 25, 362-6.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.

Sakisaka, T. and Takai, Y. (2004). Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr Opin Cell Biol* 16, 513-21.

Sakisaka, T. and Takai, Y. (2005). Cell adhesion molecules in the CNS. *J Cell Sci* 118, 5407-10.

Sakurai, T., Lustig, M., Babiarz, J., Furley, A. J., Tait, S., Brophy, P. J., Brown, S. A., Brown, L. Y., Mason, C. A. and Grumet, M. (2001). Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* 154, 1259-73.

Sanes, J. R. and Lichtman, J. W. (1999). Can molecules explain long-term potentiation? *Nat Neurosci* 2, 597-604.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

Sargiannidou, I., Markoullis, K. and Kleopa, K. A. (2010). Molecular mechanisms of gap junction mutations in myelinating cells. *Histol Histopathol* 25, 1191-206.

Savvaki, M., Theodorakis, K., Zoupi, L., Stamatakis, A., Tivodar, S., Kyriacou, K., Stylianopoulou, F. and Karagogeos, D. (2010). The expression of TAG-1 in glial cells is sufficient for the formation of the juxtapanodal complex and the phenotypic rescue of tag-1 homozygous mutants in the CNS. *J Neurosci* 30, 13943-54.

Schafer, M. K., Nam, Y. C., Moumen, A., Keglwich, L., Bouche, E., Kuffner, M., Bock, H. H., Rathjen, F. G., Raoul, C. and Frotscher, M. (2010). L1 syndrome mutations impair neuronal L1 function at different levels by divergent mechanisms. *Neurobiol Dis* 40, 222-37.

Scheper, G. C., van Berkel, C. G., Leisle, L., de Groot, K. E., Errami, A., Jentsch, T. J. and Van der Knaap, M. S. (2010). Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet Test Mol Biomarkers* 14, 255-7.

Schmid, R. S. and Maness, P. F. (2008). L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 18, 245-50.

Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E. S., Schmitz, B. and Schachner, M. (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43, 12-31.

Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R. and Lesch, K. P. (2003). The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* 44, 283-95.

Schnaar, R. L. and Lopez, P. H. (2009). Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res* 87, 3267-76.

Seifert, G., Huttmann, K., Binder, D. K., Hartmann, C., Wyczynski, A., Neusch, C. and Steinhauser, C. (2009). Analysis of astroglial K<sup>+</sup> channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J Neurosci* 29, 7474-88.

Seifert, G., Schilling, K. and Steinhauser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7, 194-206.

Sen, E. and Levison, S. W. (2006). Astrocytes and developmental white matter disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12, 97-104.

Sener, R. N. (2003a). Leukoencephalopathy with patchy lesions, temporal cystic degeneration, and normal head size. *Comput Med Imaging Graph* 27, 87-91.

Sener, R. N. (2003b). Proton MR spectroscopy demonstration of taurine peaks in megalencephalic leukoencephalopathy with cysts. *Comput Med Imaging Graph* 27, 23-6.

Shikanai, M., Nakajima, K. and Kawauchi, T. (2011). N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. *Commun Integr Biol* 4, 326-30.

Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2009). Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr* 3, 64-70.

Shyu, Y. J., Liu, H., Deng, X. and Hu, C. D. (2006). Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques* 40, 61-6.

Sik, A., Smith, R. L. and Freund, T. F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101, 51-65.

Singhal, B. S., Gorospe, J. R. and Naidu, S. (2003). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *J Child Neurol* 18, 646-52.

Singhal, B. S., Gursahani, R. D., Udani, V. P. and Biniwale, A. A. (1996). Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr Neurol* 14, 291-6.



Sintes, J., Vidal-Laliena, M., Romero, X., Tovar, V. and Engel, P. (2007). Characterization of mouse CD229 (Ly9), a leukocyte cell surface molecule of the CD150 (SLAM) family. *Tissue Antigens* 70, 355-62.

Smart, T. G. (2010). Handling accumulated internal Cl<sup>-</sup> at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13, 1043-4.

Smith, R. L., Clayton, G. H., Wilcox, C. L., Escudero, K. W. and Staley, K. J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J Neurosci* 15, 4057-67.

Spiegel, I., Adamsky, K., Eisenbach, M., Eshed, Y., Spiegel, A., Mirsky, R., Scherer, S. S. and Peles, E. (2006). Identification of novel cell-adhesion molecules in peripheral nerves using a signal-sequence trap. *Neuron Glia Biol* 2, 27-38.

Steinmeyer, K., Ortland, C. and Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301-4.

Suzuki, M. and Raisman, G. (1994). Multifocal pattern of postnatal development of the macroglial framework of the rat fimbria. *Glia* 12, 294-308.

Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H. and Rikitake, Y. (2008). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 309-42.

Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T. and Ikeda, W. (2003). Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci* 94, 655-67.

Takai, Y. and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116, 17-27.

Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci* 8, 11-20.

Tannous, B. A., Kim, D. E., Fernandez, J. L., Weissleder, R. and Breakefield, X. O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* 11, 435-43.

Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007). Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol Dis* 26, 532-45.

Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J. A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genet* 13, 2581-94.

Thelen, K., Kedar, V., Panicker, A. K., Schmid, R. S., Midkiff, B. R. and Maness, P. F. (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22, 4918-31.

Theodosis, D. T., Poulain, D. A. and Oliet, S. H. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88, 983-1008.

Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M. and Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60.

Togashi, H., Miyoshi, J., Honda, T., Sakisaka, T., Takai, Y. and Takeichi, M. (2006). Interneurite affinity is regulated by heterophilic nectin interactions in concert with the cadherin machinery. *J Cell Biol* 174, 141-51.

Togashi, H., Sakisaka, T. and Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh Migr* 3, 29-35.

Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J. S., Ozguc, M. and Seboun, E. (2000). Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am J Hum Genet* 66, 733-9.

Topcu, M., Saatci, I., Topcuoglu, M. A., Kose, G. and Kunak, B. (1998). Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Dev* 20, 142-53.

Tsujino, S., Kanazawa, N., Yoneyama, H., Shimono, M., Kawakami, A., Hatanaka, Y., Shimizu, T. and Oba, H. (2003). A common mutation and a novel mutation in Japanese patients with van der Knaap disease. *J Hum Genet* 48, 605-8.

Valverde, M. A. (1999). CIC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millennium. *Curr Opin Cell Biol* 11, 509-16.

van der Knaap, M. S., Barth, P. G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W. F., Hoogenraad, F. and Valk, J. (1995a). Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol* 37, 324-34.

van der Knaap, M. S., Barth, P. G., Vrensen, G. F. and Valk, J. (1996). Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol* 92, 206-12.

van der Knaap, M. S., Lai, V., Kohler, W., Salih, M. A., Fonseca, M. J., Benke, T. A., Wilson, C., Jayakar, P., Aine, M. R., Dom, L. et al. (2010). Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Ann Neurol* 67, 834-7.

- van der Knaap, M. S., Valk, J., Barth, P. G., Smit, L. M., van Engelen, B. G. and Tortori Donati, P. (1995b). Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology* 37, 679-86.
- Verma, R., Mukerji, M., Grover, D., C, B. R., Das, S. K., Kubendran, S., Jain, S. and Brahmachari, S. K. (2005). MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol Psychiatry* 58, 16-22.
- Walz, W. (2002). Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* 40, 1-10.
- Wang, J., Shang, J., Wu, Y., Gu, Q., Xiong, H., Ding, C., Wang, L., Gao, Z., Wu, X. and Jiang, Y. (2011). Identification of novel MLC1 mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *J Hum Genet* 56, 138-42.
- Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J. A., Christopherson, K. S. and El-Husseini, A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 24, 9244-9.
- Weiner, J. A., Wang, X., Tapia, J. C. and Sanes, J. R. (2005). Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8-14.
- Weller, S. and Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18, 1-12.
- Williamson, M. P. and Sutcliffe, M. J. (2010). Protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 38, 875-8.
- Wu, Q. and Maniatis, T. (1999). A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* 97, 779-90.
- Yaguchi, T. and Nishizaki, T. (2010). Extracellular high K<sup>+</sup> stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels. *J Cell Physiol* 225, 512-8.
- Yalcinkaya, C., Yuksel, A., Comu, S., Kilic, G., Cokar, O. and Dervent, A. (2003). Epilepsy in vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Seizure* 12, 388-96.
- Yamagata, M., Sanes, J. R. and Weiner, J. A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15, 621-32.
- Yamaguchi, A., Hori, O., Stern, D. M., Hartmann, E., Ogawa, S. and Tohyama, M. (1999). Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol* 147, 1195-204.

Yap, A. S. and Kovacs, E. M. (2003). Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* 160, 11-6.

Yuzbasioglu, A., Topcu, M., Cetin Kocaefe, Y. and Ozguc, M. (2011). Novel mutations of the MLC1 gene in Turkish patients. *Eur J Med Genet* 54, 281-3.

Zawarynski, P., Tallerico, T., Seeman, P., Lee, S. P., O'Dowd, B. F. and George, S. R. (1998). Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* 441, 383-6.

Zhang, D., Stumpo, D. J., Graves, J. P., DeGraff, L. M., Grissom, S. F., Collins, J. B., Li, L., Zeldin, D. C. and Blackshear, P. J. (2006). Identification of potential target genes for RFX4\_v3, a transcription factor critical for brain development. *J Neurochem* 98, 860-75.

Zhang, H. and Verkman, A. S. (2008). Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci* 37, 1-10.

Zhang, Y., Yeh, J., Richardson, P. M. and Bo, X. (2008a). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily in axonal regeneration and neural repair. *Restor Neurol Neurosci* 26, 81-96.

Zhang, Y., Zhang, H., Feustel, P. J. and Kimelberg, H. K. (2008b). DCPIB, a specific inhibitor of volume regulated anion channels (VRACs), reduces infarct size in MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra. *Exp Neurol* 210, 514-20.

Zhao, H., Hyde, R. and Hundal, H. S. (2004). Signalling mechanisms underlying the rapid and additive stimulation of NKCC activity by insulin and hypertonicity in rat L6 skeletal muscle cells. *J Physiol* 560, 123-36.

Zuniga, L., Niemeyer, M. I., Varela, D., Catalan, M., Cid, L. P. and Sepulveda, F. V. (2004). The voltage-dependent CIC-2 chloride channel has a dual gating mechanism. *J Physiol* 555, 671-82.



**ANEXO: ARTÍCULOS  
PUBLICADOS**



**Artículo aceptado en Agosto de 2008 en  
la revista HUMAN MOLECULAR  
GENETICS**





# Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in *MLC1* cause folding defects

Anna Duarri<sup>1,2,4,5,†</sup>, Oscar Teijido<sup>8,†</sup>, Tania López-Hernández<sup>2,†</sup>, Gert C. Scheper<sup>10</sup>, Herve Barriere<sup>11</sup>, Ilja Boor<sup>10</sup>, Fernando Aguado<sup>9</sup>, Antonio Zorzano<sup>7,8</sup>, Manuel Palacín<sup>5,6</sup>, Albert Martínez<sup>9</sup>, Gergely L. Lukacs<sup>11</sup>, Marjo S. van der Knaap<sup>10</sup>, Virginia Nunes<sup>1,3,4,†</sup> and Raúl Estévez<sup>2,5,8,\*,†</sup>

<sup>1</sup>CGMM-IDIBELL Gran Via s/n Km. 2,7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain, <sup>2</sup>Sección de Fisiología and <sup>3</sup>Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, IDIBELL-Universidad de Barcelona, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain, <sup>4</sup>CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-730, ISCIII, <sup>5</sup>CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-750, ISCIII, <sup>6</sup>CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-731, ISCIII, <sup>7</sup>CIBERDEM, ISCIII, Barcelona, Spain, <sup>8</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology and <sup>9</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Institute for Research in Biomedicine (IRB), Josep Samitier 1-5, Barcelona E-08028, Spain, <sup>10</sup>Department of Pediatrics/Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands and <sup>11</sup>Department of Physiology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3G 1Y6

Received July 24, 2008; Revised and Accepted August 28, 2008

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy, most often caused by mutations in the *MLC1* gene. *MLC1* is an oligomeric plasma membrane (PM) protein of unknown function expressed mainly in glial cells and neurons. Most disease-causing missense mutations dramatically reduced the total and PM *MLC1* expression levels in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. The impaired expression of the mutants was verified in primary cultures of rat astrocytes, as well as human monocytes, cell types that endogenously express *MLC1*, demonstrating the relevance of the tissue culture models. Using a combination of biochemical, pharmacological and imaging methods, we also demonstrated that increased endoplasmatic reticulum-associated degradation and endo-lysosomal-associated degradation can contribute to the cell surface expression defect of the mutants. Based on these results, we suggest that *MLC1* mutations reduce protein levels *in vivo*. Since the expression defect of the mutants could be rescued by exposing the mutant-protein expressing cells to low temperature and glycerol, a chemical chaperone, we propose that MLC belongs to the class of conformational diseases. Therefore, we suggest the use of pharmacological strategies that improve *MLC1* expression to treat MLC patients.

## INTRODUCTION

Leukodystrophies encompass a broad spectrum of inherited neurodegenerative disorders that affect brain white matter (1,2). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare new leukodystrophy (3–6). Recognition

of MLC was made possible only 13 years ago by means of magnetic resonance imaging (5,7). Its clinical characteristics are macrocephaly noted in the first years of life, motor disability and mild cognitive decline (5,8,9). In contrast to many other leukodystrophies, MLC progression is very slow (5,10,11).

\*To whom correspondence should be addressed. [restevez@ub.edu](mailto:restevez@ub.edu)

†These authors contributed equally to this study.

Mutations in the *MLC1* gene are the main cause of disease (12–14), although other unknown genes are also involved (15,16). In addition, there is a high intrafamilial variability, which may indicate the influence of modifier genes or environmental factors in the disease phenotype (13).

MLC1 is an oligomeric membrane protein with eight predicted transmembrane segments (17). Its homology to carrier proteins and its confinement to the plasma membrane (PM) suggest that it may mediate substrate translocation across the cell surface (12,18). Unfortunately, its precise role in the cellular physiology has not been identified yet (17,19).

Expression studies with RNA and antibody probes indicated that MLC1 is located in two neural populations: glial cells (17,20–23) and neurons (17,20). Specifically, in glial cells, it is concentrated in membrane contact regions, being enriched in distal glial processes and Bergman cerebellar glia. At present, it is still uncertain whether MLC1 is localized in membrane contact regions between endothelial cells and glial cells (i.e. forming part of the dystrophin glycoprotein complex) or in membrane contact regions between different glial cells (20,23,24). Although the exact localization has to be defined, the closer relationship with brain barriers suggest that MLC1 could participate in transport processes across the blood-brain and brain-cerebrospinal fluid barriers.

To study the molecular basis of the disease, in a previous work, we described a biochemical method to measure the levels of MLC1 protein at the PM in heterologous systems (17). Two studies with eight different *MLC1* mutations (17,25) showed that mutations led to a reduced protein dosage. Here, we studied most of the *MLC1* missense mutations (including one in-frame deletion) identified to date in heterologous systems as well as in primary rat astrocytes, a cell system with endogenous expression of MLC1 (26). Our results clarify the degradation pathways that follow these mutants. Moreover, using a new generated antibody, we showed for the first time that mutations also dramatically decrease the levels of MLC1 in cells from MLC patients. The data presented here provide insights for understanding the relationship between the clinical phenotypes and the molecular defects of the protein. This work suggests that a common therapy used to improve MLC1 protein expression may be useful for the treatment of MLC patients.

## RESULTS

### Reduced PM expression of most MLC1 mutants

*MLC1* gene encodes a membrane protein with a low degree of homology to the Kv1.1 potassium channel (13,18). We and others have failed to detect ion channel activity after its expression in several heterologous systems (17,19). As an alternative approach, we described a biochemical method to quantify the PM levels of MLC1 (17). To study the effect of most of the missense mutations including a deletion in a conserved poly-leucine stretch (26,27) (Fig. 1A), we introduced each of these mutations in human MLC1 containing two HA epitope tags and assayed the PM expression in the *Xenopus* oocyte system (Fig. 1B). We also measured protein expression levels by western blot analysis of total protein extracts. The same parameters were analysed in selected mutations in HeLa

cells (Fig. 1C). Differences in surface expression for different mutants were found between these two systems, probably because the *Xenopus* oocyte is more permissive to folding mutants (28), due to its lower incubation temperature (18°C).

Most mutations dramatically reduced PM levels (Fig. 1). Western-blot analyses of cell extracts showed that steady-state protein values were also reduced in parallel (data not shown). We classified the mutations in three classes on the basis of their effect on PM expression levels: severe mutations (in black) reduced PM levels to less than 35% of wild-type (wt) MLC1 value in oocytes, intermediate mutations with PM levels >35% of wt MLC1 value in oocytes and PM levels <10% of wt MLC1 value in HeLa cells (in grey) and mild mutations with PM levels >10% of wt MLC1 value in HeLa cells (in white). P294L mutant was considered as severe (not shown) on the basis of its total protein levels. Of the 21 mutants studied, only three (N141K, S246R and the deletion in frame of leucines 304 and 305) had slightly reduced or similar PM levels compared with wt MLC1.

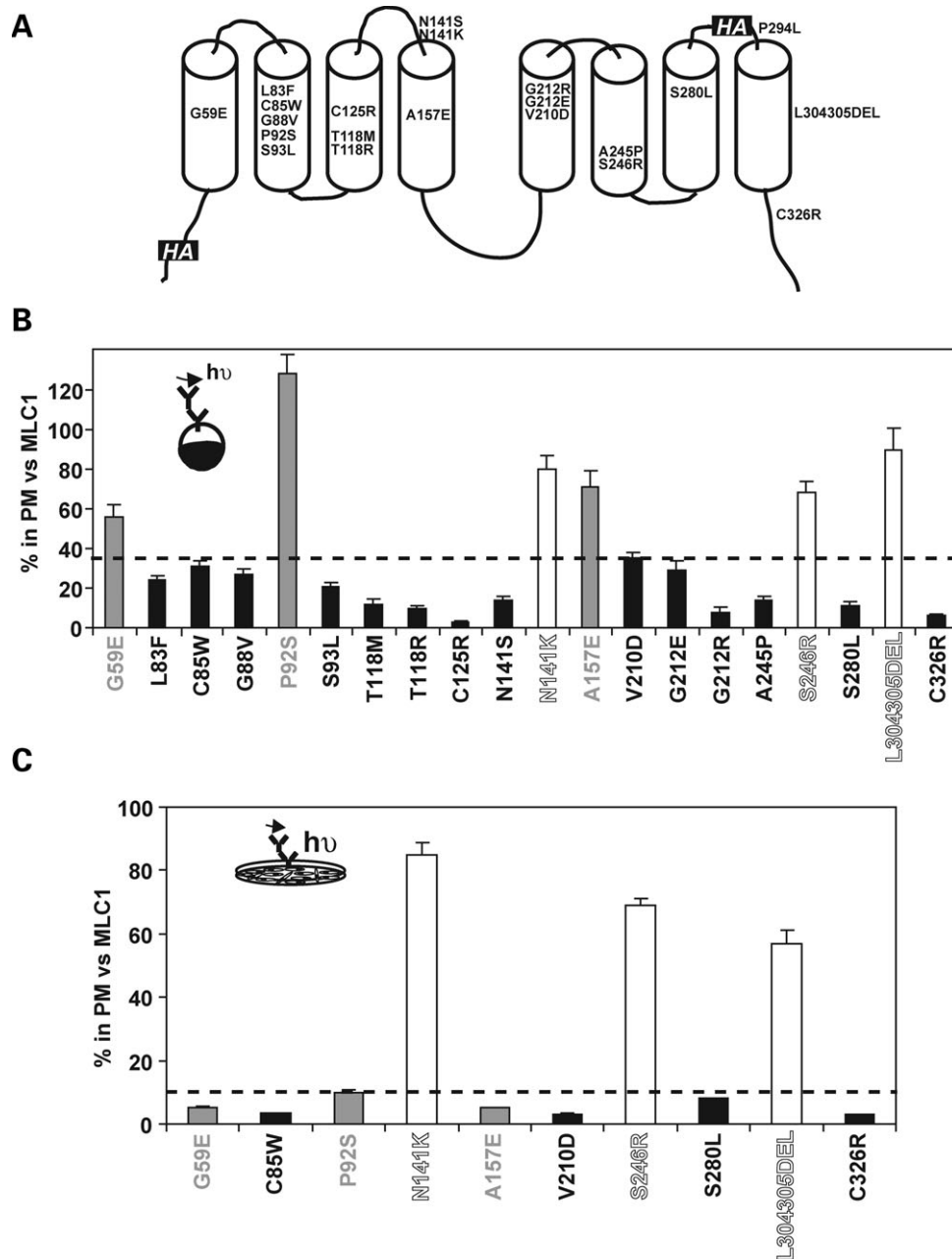
### Reduced stability of MLC1 mutants

We subsequently studied the protein stability of selected mutants of each class by measuring the remaining protein after incubation with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (Fig. 2). For reasons of clarity, in western blot experiments, we only focused on the band corresponding to the monomeric form of MLC1, because it is the most abundant. Severe mutants (C326R and V210D) were less stable than intermediate (G59E) or mild mutants (S246R), suggesting that reduced PM protein levels mirror protein stability values (Fig. 2).

### Intracellular retention of MLC1 mutants

The reduced stability of the mutants was suggestive of altered intracellular processing. It is feasible to study the intracellular processing of glycoproteins, such as CFTR (29), because by monitoring their glycosylation state by western blot one can distinguish between the endoplasmic reticulum (ER) resident protein and the fully glycosylated mature protein. Unfortunately, although MLC1 has a putative glycosylation site between the putative transmembrane domains 3 and 4, it is not glycosylated (17) (Fig. 3B). We constructed a chimeric protein with glycosylation sites in this predicted extracellular loop (MLC1GLYC, Fig. 3A) as a way to follow its intracellular processing. Whereas wt MLC1 size was not altered after treatment with Endoglycosidase F (EndoF) (Fig. 3B), which removes most of the glycans, the size of the heavy molecular weight bands of MLC1GLYC was reduced, indicating that it was, in fact, glycosylated (Fig. 3B, bracket). A minor proportion did not change its size after EndoF treatment, probably indicating a non-glycosylated protein fraction (Fig. 3B, arrow).

We next addressed the sensitivity of MLC1GLYC to Endoglycosidase H (EndoH), because it indicates the presence of proteins that have not yet been processed beyond the ER. Most of the glycosylated protein was insensitive to EndoH (Fig. 3C, bracket), indicating that it was fully processed, and only a minor proportion of glycosylated protein (Fig. 3C, asterisk) was EndoH sensitive, probably indicating the

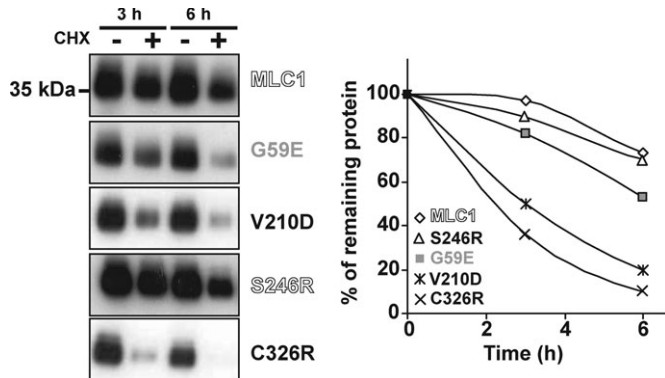


**Figure 1.** Reduced PM expression of most MLC1 mutants in *Xenopus* oocytes and HeLa cells. (A) A predicted 2D model of the MLC1 protein, showing the location of the mutations studied and the introduced HA epitope tags. (B) Oocytes were injected with 10 ng of each cRNA construct, and the PM levels were measured using a luminescence-based method. The signal of non-injected oocytes was always below 5% the signal of wild-type (wt) MLC1-injected oocytes. Surface expression was normalized with the expression of wt MLC1. Data correspond to the summary of three experiments with  $n \geq 30$  oocytes per construct. The inset shows an overview of the method. The total protein steady-state levels were reduced in parallel with their surface expression level (not shown). The dotted line indicated 35% in PM versus wt MLC1, a criteria used to classify the mutants. (C) PM analysis using a luminescence-based method in HeLa cells transfected with wt MLC1 or the selected mutants. Surface expression was normalized with the expression of wt MLC1. Data correspond to two or three experiments with  $n \geq 8$  data points per construct. The inset shows an overview of the method. Total protein levels of each mutant were analysed at least twice in western blot studies. The dotted line indicated 10% in PM versus wt MLC1, a criteria used to classify the mutants. Mutations were classified in three classes on the basis of their effect on PM expression levels: severe (in black), intermediate (in grey) and mild (in white).

ER-resident form. In agreement with being fully processed, we were able to detect MLC1GLYC at the surface by luminescence-based experiments (data not shown).

We subsequently introduced selected mutations into the reporter MLC1GLYC and addressed the post-translational modifications in their glycosylation (Fig. 3C). Whereas

a mild mutant as MLC1GLYC S246R was very similar to MLC1GLYC protein, severe mutants as MLC1GLYC S280L or MLC1GLYC C326R did not acquire a fully glycosylated state. In these severe mutants, the glycosylated band was sensitive to EndoH treatment, indicating that these mutants were not able to reach the medial Golgi compartment (Fig. 3C).



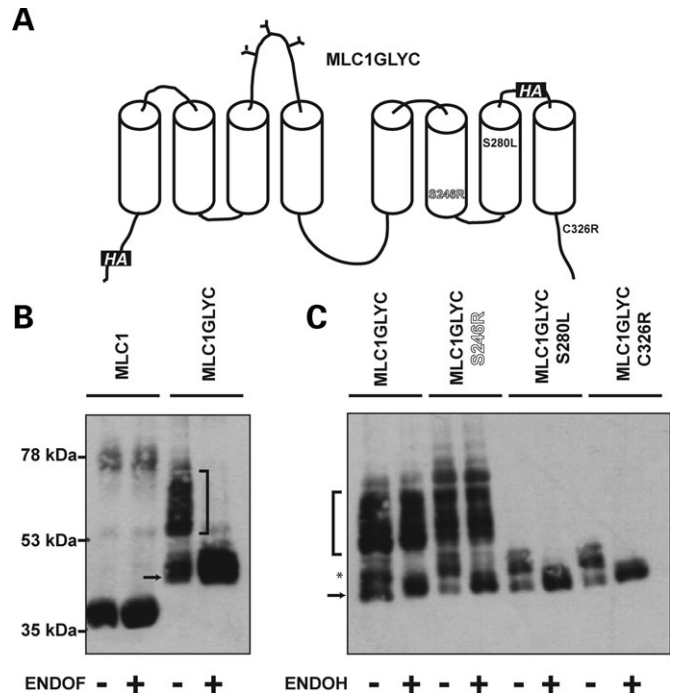
**Figure 2.** Decreased stability of MLC1 mutants. HeLa cells transfected with wt MLC1 or the G59E, V210D, S246R and C326R mutants containing HA tags were incubated with the protein synthesis inhibitor CHX (100  $\mu$ g/ml) for the times indicated (0, 3 and 6 hours). Cells were harvested, solubilized and processed by western blot against the HA epitope. No signal was detected in non-transfected cells. Exposure times varied for the mutants in order to clearly show the decrease in steady-state protein levels. Here, we also show that expression levels of the proteins without CHX were similar at all times indicated. On the right, a quantification of this experiment with adequate exposition times, using ImageJ software, is shown. Ponceau staining was used as a loading control. Two independent experiments gave similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

### Lysosomal targeting and degradation of MLC1 mutants

Taken together, these experiments suggested that most mutants are retained in the ER, where they will probably be targeted for degradation by the proteasome. However, we found that some mutants can partially reach the PM (Fig. 1). We speculated that these mutants could be degraded in lysosomes. To address what were the degradation pathways, we measured the remaining protein of selected mutants after incubation with the protein synthesis inhibitor CHX in the presence of a proteasomal inhibitor (MG132), or in the presence of two different lysosomal inhibitors (ammonium chloride and pepstatin plus leupeptin) (30) (Fig. 4A). These inhibitors increased protein levels with different efficiencies (Fig. 4A). The house-keeping  $\beta$ -actin protein was used as a loading control. These experiments suggested that both ERAD and ELAD contribute to their degradation.

Conceivably, mutants might reach the lysosomes from the PM. To explore this possibility, we first studied the turnover of a selected intermediate mutant (in order to have enough detection sensitivity) at the cell surface (P92S). The cell-surface half-life ( $T_{1/2}$ ) of P92S mutant was about 10 times lower ( $T_{1/2} \sim 4$  h) than that of the wt MLC1, determined by the disappearance of the anti-HA antibody binding in the presence of CHX (Fig. 4B). Similar results were obtained for the severe mutant S280L (19).

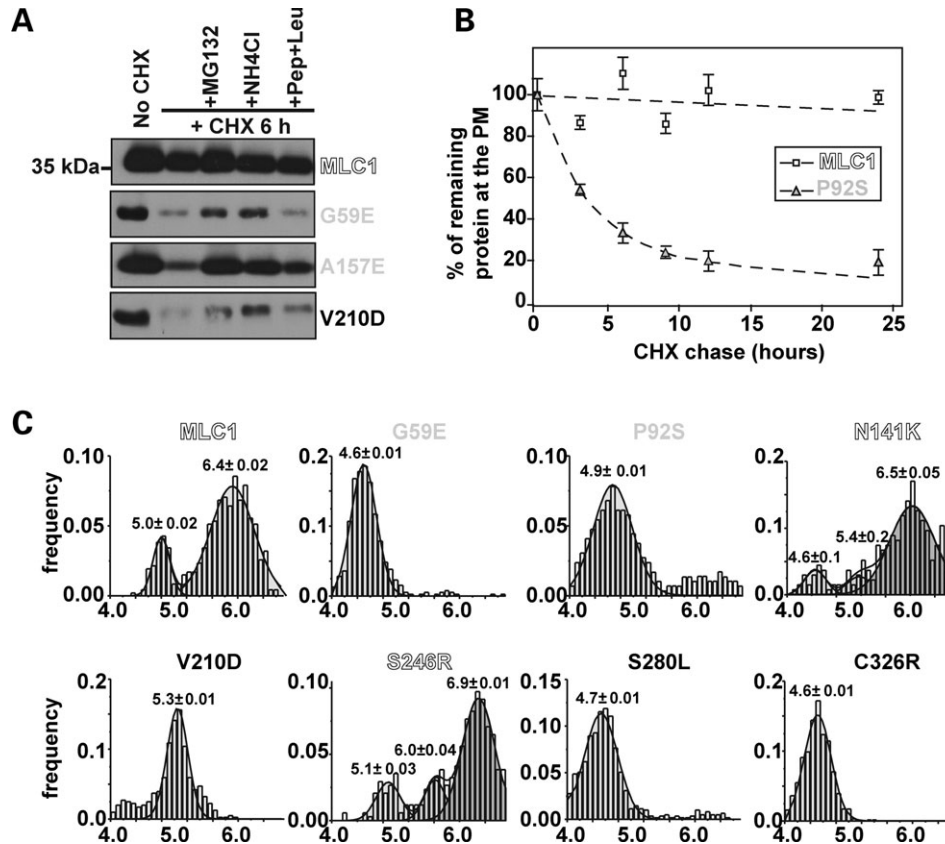
Next, we determined the destination of internalized mutants by monitoring the vesicular pH of MLC1 containing vesicles (Fig. 4C). Transiently transfected COS cells were incubated with anti-HA antibody complexes with Fab fragments conjugated to the pH-sensitive fluorophore FITC. We used COS cells, because they have increased total and surface expression of the mutants. The antibody-MLC1 complex was internalized and chased at 37°C. The luminal pH of MLC1-positive intracellular vesicles was accomplished by fluorescence ratiometric



**Figure 3.** ER retention of MLC1 mutant proteins. (A) Schematic 2D model of the chimera MLC1GLYC reporter protein, indicating the highly glycosylated loop from the LAT4 transporter (44), added between the putative transmembrane domains 3 and 4, the presence of the two HA epitope tags and the mutations studied with this reporter protein. (B) Extracts from transfected HeLa cells with wt MLC1 or MLC1GLYC containing HA tags were treated with Endoglycosidase F (EndoF), which cleaved glycans of both the high-mannose and the complex type linked through asparagine to the protein backbone. No change in the motility of wt MLC1 was observed after incubating with EndoF; in contrast, the motility of the heavy molecular weight bands from MLC1GLYC (bracket) was reduced, indicating that it was glycosylated. Probably, the lower molecular band of MLC1GLYC (arrow) corresponds to an unglycosylated protein form. The band around 78 kDa of wt MLC1 probably corresponds to the dimeric form. (C) Extracts from transfected HeLa cells with MLC1GLYC alone or MLC1GLYC containing selected mutations were processed by incubation with Endoglycosidase H (EndoH), which is able to remove glycans only if they have not suffered modifications in the Golgi complex. A high molecular weight broad band (bracket) EndoH insensitive in MLC1GLYC and MLC1GLYC S246R was not present in MLC1GLYC S280L or MLC1GLYC C326R. Only a lower molecular weight minor band (asterisk), that was the only glycosylated protein form present in the mutants S280L and C326R was sensitive to EndoH. These results suggest that these mutants are mostly retained in the ER. The band with lower molecular weight (arrow) of MLC1GLYC probably corresponds to an unglycosylated protein form, because its motility does not change after EndoH or EndoF treatment. Another independent experiment gave similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

video image analysis as described previously for a panel of internalized cargo (31,32). Internalized MLC1 was detected mainly in vesicles with luminal pH of  $6.4 \pm 0.02$  ( $n = 468$  vesicles) (Fig. 4C), typical of recycling endosomes. In contrast, intermediate mutants G59E and P92S or severe mutants V210D, S280L and C326R were mainly confined to vesicles with luminal pH  $\leq 5.3$  ( $n > 475$  vesicles) (Fig. 4B), characteristic of late endosomes and lysosomes, a finding consistent with their increased cell surface turnover. Mild mutants S246R and N141K were also mainly present in recycling endosomes.





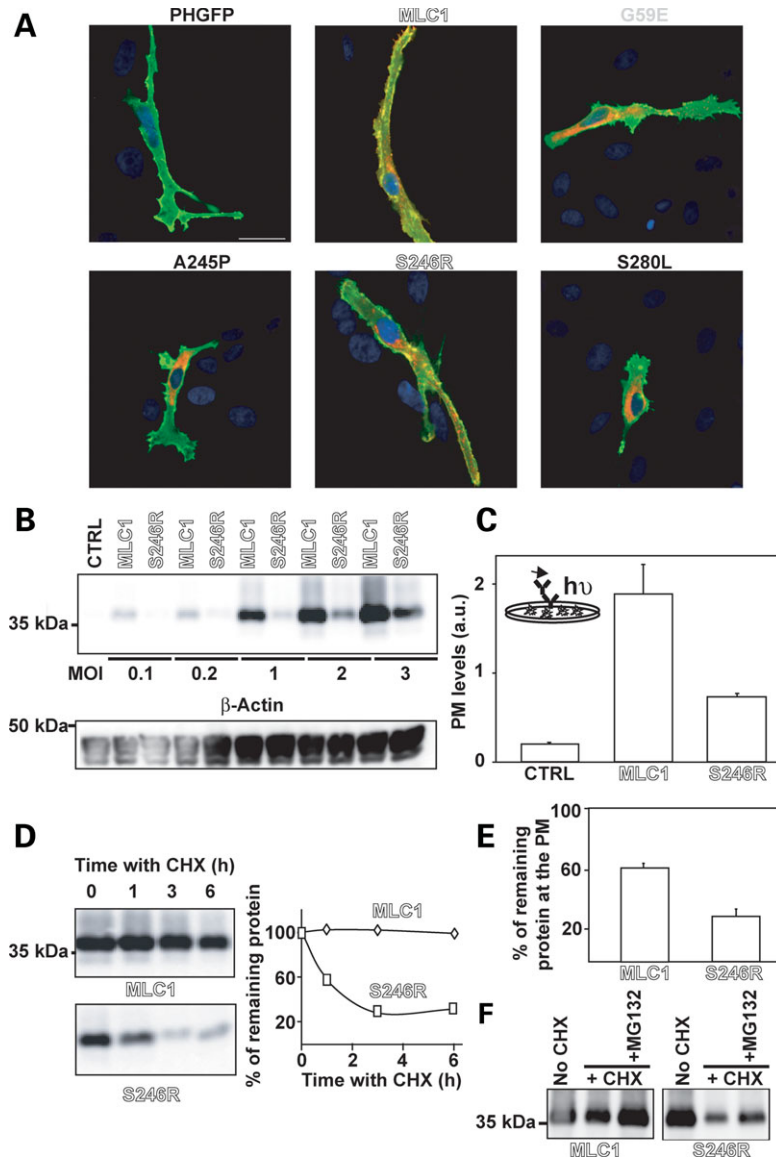
**Figure 4.** Lysosomal degradation of MLC1 mutants. (A) Transfected HeLa cells with wt MLC1 or the indicated mutants containing *HA* tags were incubated or not 24 h after transfection with the protein synthesis inhibitor CHX (100  $\mu$ g/ml) for 6 h plus the proteasomal inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132, 50  $\mu$ M) or several lysosomal inhibitors [ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM) or pepstatin plus leupeptin (Pep + Leu, 5  $\mu$ g/ml each)]. Cell extracts were obtained and processed by western blot. From three different experiments, for mutants G59E, A157E and V210D, respectively, densitometry studies indicated that MG132 increased mutant expression levels (in percentage) to 22, 31, 36; ammonium chloride to 21, 32, 33 and pepstatin plus leupeptin to 8, 13, 9.  $\beta$ -actin protein detection was used as a loading control. (B) Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with CHX. At a range of time points, cells were washed and fixed. PM levels were measured using a luminescence-based method. The signal was normalized to the value at time 0 for each of the experimental groups (wt MLC1 or P92S). The result is a representative experiment of two experiments with similar results. (C) Transiently transfected COS cells were incubated at 37°C for 90 min with FITC-conjugated anti-mouse Fab fragments and anti-*HA* antibody and chased in the absence of antibodies for 30 min before live imaging. The pH of individual vesicles was measured by fluorescence ratiometric video-image analysis. The figure shows the vesicular pH distribution of endocytosed wt MLC1 and MLC1 mutants. These distributions were obtained from 468, 482, 567, 671, 604, 529, 615 and 639 vesicles for wt MLC1, G59E, P92S, N141K, V210D, S246R, S280L and C326R, respectively. They were obtained in three independent experiments. The results show that severe and intermediate MLC1 mutants are mostly localized in lysosomes after internalization from the PM. A minor proportion of wt MLC1 protein is also targeted to lysosomes, probably as a consequence of the overexpression. Mild mutants N141K and S246R were similar to wt MLC1, although a three-Gaussian distribution was used to fit the average pH of each type of vesicle population (see Material and Methods). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

### Biochemical investigation of MLC1 mutants in astrocytes

The rapid turnover of the mutants could be due to the heterologous systems used (oocytes, HeLa and COS cells), which do not express MLC1 endogenously. Experimental work by several groups has detected *MLC1* mRNA and protein in brain astrocytes (17,21–23). We, therefore, isolated primary rat cortical brain astrocytes and confirmed its expression (not shown). Initially, we co-transfected wt MLC1 and selected mutants together with the GFP-tagged pleckstrin homology domain of PLC $\delta$ 1 (PH-GFP), a fluorescent protein probe that labels the PM (33). No *HA* antibody signal was detected in non-transfected astrocytes (Fig. 5A). MLC1 was detected at the PM, mainly colocalizing with PH-GFP (yellow staining) (Pearson's correlation coefficient:  $R_r = 0.8 \pm 0.02$ ,  $n = 10$ ). In contrast, the intermediate mutant G59E or the severe mutants A245P and S280L were almost exclusively detected

in intracellular compartments (Fig. 5A), showing less degree of colocalization with PH-GFP (G59E:  $R_r = 0.5 \pm 0.07$ ; A245P:  $R_r = 0.4 \pm 0.05$ ; S280L:  $R_r = 0.4 \pm 0.07$ ;  $n = 10$ ). Interestingly, although the mild mutant S246R was also detected at the PM, intracellular staining was greater than that of wt MLC1 (Fig. 5A), as measured in a reduced colocalization with PH-GFP ( $R_r = 0.6 \pm 0.04$ ,  $n = 10$ ).

These experiments suggested that the measured severity of the mild mutant S246R was higher in the astrocyte model. To verify these results with another experimental approach, we decided to study this mutant in more detail, performing biochemical quantification experiments of protein levels, as described before. Viral systems allow a high efficiency of expression in primary cultures. We, therefore, constructed adenoviruses expressing wt MLC1 or the mutant S246R. Infecting with these adenoviruses at different MOI revealed that the expression of mutant S246R was reduced at all MOI studied



**Figure 5.** Expression of MLC1 mutants in rat primary astrocyte cultures. (A) Astrocytes were co-transfected with PH-GFP (pleckstrin homology domain of PLC $\delta$ 1 fused to green fluorescent protein), as a marker of PM, together with wt MLC1 or the indicated mutants (G59E, A245P, S246R and S280L) containing HA tags. Cells were fixed and permeabilized, and immunofluorescence was performed using 3F10 (against the HA tags) as a primary antibody. No signal due to the HA epitope was observed in cells transfected only with the PH-GFP plasmid. The bar line correspond to 20  $\mu$ m. Nuclei were stained using DAPI. PH-GFP is shown in green, MLC1 in red, nuclei in blue and colocalization between the green channel and the red channel in yellow. The degree of colocalization between PH-GFP and MLC1 proteins was analysed using the Pearson's correlation coefficient (Rr) obtained with an ImageJ software plugin, using 10 single plane images from different cells corresponding to two independent experiments. The values of Rr were  $0.8 \pm 0.02$ ,  $0.5 \pm 0.07$ ,  $0.4 \pm 0.05$ ,  $0.6 \pm 0.04$  and  $0.4 \pm 0.07$  for wt MLC1, G59E, A245P, S246R and S280L, respectively. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1. (B) Astrocytes were infected or not with adenoviruses expressing wt MLC1 or S246R mutant containing two HA tags at different MOI. Forty-eight hours later, extracts were obtained and analysed by western blot. At equal MOI, the expression of the S246R mutant was always lower than wt MLC1.  $\beta$ -Actin detection by western blot was used as a loading control. (C) Astrocytes were infected with adenoviruses expressing wt MLC1 or the mutant S246R with HA tags at MOI = 2. PM levels of wt MLC1 and S246R mutant were measured using a luminescence-based method, as described in Materials and Methods. The luminescence signal of non-infected astrocytes was always lower than the signal from infected astrocytes with MLC1 proteins. Data correspond to an independent experiment with four data points per construct, and are expressed in light arbitrary units (a.u.). From six independent experiments ( $n = 24$ ), the level of the S246R mutant in comparison with wt MLC1 was  $26 \pm 5\%$ . The inset shows an overview of the method. (D) Astrocytes were infected or not with adenoviruses expressing wt MLC1 and S246R mutant with HA tags at MOI = 2. Thirty-six hours post-infection, cells were treated or not with cycloheximide (CHX, 100  $\mu$ g/ml) at the times indicated. Cell extracts were obtained, and the remaining protein was analysed by western-blot against the HA epitope.  $\beta$ -Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). The result is a representative experiment of three with similar results. On the right, a quantification of this experiment using ImageJ software is shown. (E) Similarly, 36 hours post-infection with the indicated adenoviruses, astrocytes were incubated or not with CHX (100  $\mu$ g/ml) for 6 h. Cells were fixed, and the levels of wt MLC1 and the S246R mutant at the PM were measured using a luminescence-based method. The signal was normalized to the value at time 0 for each of the experimental group (wt MLC1 or S246R). Data correspond to a summary of three independent experiments ( $n = 12$ ). Wt MLC1 surface levels were reduced to  $59.3 \pm 4.1\%$  and S246R mutant to  $35.1 \pm 7.1\%$ . (F) In a similar manner, infected astrocytes were incubated with CHX (100  $\mu$ g/ml) together or not with the proteasome inhibitor MG132 (50  $\mu$ M) for 6 h. Cell extracts were processed by western blot.  $\beta$ -Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). The result is a representative experiment of three with similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

(Fig. 5B). At MOI = 2, surface expression of the mutant S246R was clearly reduced to  $26 \pm 5\%$  ( $n = 24$ ) of wt MLC1 values (Fig. 5C). Incubation with CHX revealed that S246R mutant showed reduced total (Fig. 5D) and PM stability levels (Fig. 5E). Possibly, this reduced stability was due to an increased proteasomal and lysosomal degradation, as incubation with the proteasomal inhibitor MG132 only partially raised S246R mutant protein levels after CHX treatment (Fig. 5F).

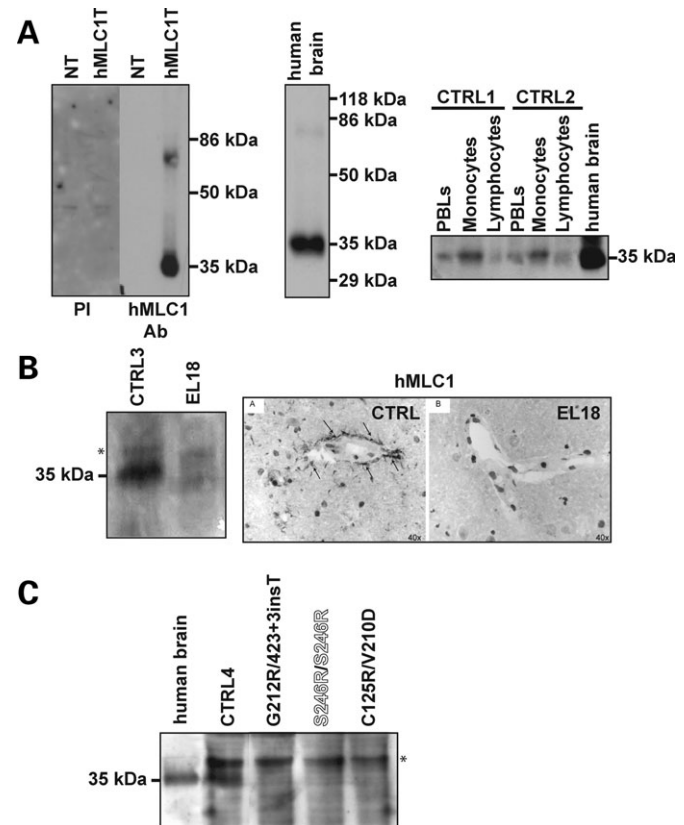
### MLC1 expression in human MLC patients

A major caveat regarding all the experiments described is that they may be artefacts caused by overexpression. To validate the relevance of these experiments in tissue culture models, we attempted to detect MLC1 protein levels by western blot in samples from MLC patients. We developed a new antibody against human MLC1 protein which was able to specifically detect human MLC1 expressed in HeLa cells and the endogenous expression in brain (Fig. 6A).

*MLC1* mRNA was reported to be expressed in peripheral blood leukocytes (PBLs) (34). At first, we attempted to detect MLC1 protein in Epstein–Barr virus-immortalized B lymphoblasts from unaffected controls, because these cells are stable and can be propagated. Unfortunately, we were unable to detect MLC1 protein expression, which may be attributed to the very low levels of mRNA expression in lymphoblasts compared with brain tissue. In fact, quantitative real-time PCR of human lymphoblast showed that these cells expressed about 1000-fold lower ( $\Delta C_t$  value, see Materials and Methods) amounts of mRNA of *MLC1* than that in brain. Due to this negative result, we tried to detect protein expression in primary PBLs cells from human unaffected controls. Additionally, to improve the detection, we separated these PBLs into monocytes and lymphocytes. A specific band, with the same size as human MLC1 detected in brain or in transfected cells, was detected in PBLs and enriched in monocytes.

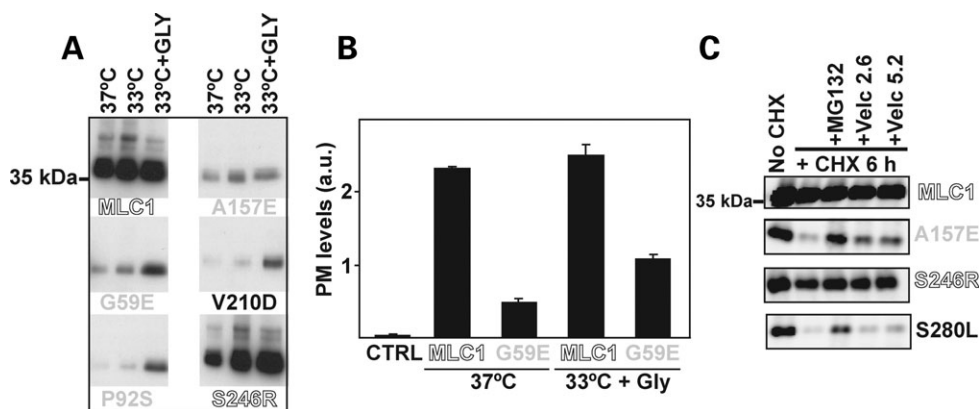
To be sure that this detected band corresponded to MLC1, we studied in parallel blood monocytes and human brain from the only MLC patient (EL18) who had adequate tissue quality (35). Although the mutations in this patient are not known, it has reduced *MLC1* mRNA levels in immortalized lymphoblasts (26). Looking at MLC1 protein expression in monocytes from this patient, no band with the same size as MLC1 was detected, compared to those from a healthy control (Fig. 6B, left). Similarly, no MLC1 immunostaining was detected in brain sections from this patient (Fig. 6B, right). Thus, we concluded that monocytes could be used to follow human MLC1 endogenous protein expression.

Then, we isolated monocytes from different MLC patients with at least a missense mutation. One of these patients harbours the mild mutation S246R in homozygous state (Fig. 6C). MLC1 protein expression was detectable in control cells, but not in patient cells. In all, these results suggested that a reduced presence of the MLC1 polypeptide may be a common phenomenon for MLC patients harbouring missense mutations.



**Figure 6.** Analysis of MLC1 expression in human MLC patients. (A) Characterization of a new polyclonal antibody against human MLC1 protein. Left panel: affinity-purified rabbit antibody against the N-terminal region of human MLC1 recognize a  $\sim 34$  kDa and a  $\sim 70$  kDa band in lysates of HeLa cells transfected with human MLC1 cDNA (hMLC1T), probably corresponding to the monomeric and dimeric form, respectively. These bands were not visible in non-transfected (NT) cells or in transfected cells (hMLC1T) using the pre-immune serum (PI). Middle panel: this antibody recognizes bands of the same size in extracts from human brain tissue, without showing any unspecific band. Right panel: fresh human PBLs were obtained using a Ficoll gradient. They were further fractionated to monocytes and lymphocytes on the basis of monocyte adherence to plastic dish. Extracts were obtained and processed for western blot analysis. A band showing the same motility as the monomeric form of MLC1 detected in human brain was specifically enriched in control monocytes (CTRL1 and CTRL2). For reasons of clarity, we only show the protein band corresponding to monomeric human MLC1, because the intensity of the band corresponding to dimeric MLC1 was lower. Cells from different controls showed variation in expression level, but this was not investigated further. (B) Left panel: fresh monocytes from an unrelated control (CTRL3) and from patient EL18 were isolated, extracts were obtained and processed by western blot. The band identified as MLC1 protein was absent in the EL18 patient. An unspecific band was visible in some monocyte extracts (asterisk). Right panel: immunohistochemical staining of MLC1 in control brain (A) and patient (EL18) tissue (B). In control tissue (A), the perivascular staining of MLC1 is visible (arrows), but no staining is observed in brain sections from the same patient (B). Cell nuclei are shown as dark circles. As a control of the integrity of the sections, GFAP had a normal staining and distribution in both control and MLC brain tissue (not shown). (C) Fresh monocytes from another unrelated control (CTRL4) and from three different MLC patients containing at least a *MLC1* missense mutation were isolated; extracts were obtained and processed by western blot. An unspecific band was visible in some monocyte extracts (asterisk). The band corresponding to monomeric MLC1 (specifically detected in human brain) was present in controls but not in monocytes from MLC patients. A loading control (translation factor eIF2 $\alpha$ ) showed equal loading of total protein of the monocyte extract samples (not shown). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.





**Figure 7.** Chemical strategies to improve MLC1 mutants expression. (A) Transfected HeLa cells were incubated at 37°C, at 33°C or at 33°C with addition of 10 mM glycerol 24 h after transfection. Twenty-four hours later after glycerol addition, cells were harvested, solubilized and processed by western blot against the HA epitope. Two other independent experiments gave similar results. (B) PM analysis using a luminescence-based method in HeLa cells transfected with wt MLC1 or the G59E mutant after incubation at 33°C plus 10 mM glycerol. Data correspond to an independent experiment with four data points per construct, and are expressed in light arbitrary units (a.u.). Another independent experiment gave similar results. (C) Transfected HeLa cells with wt MLC1 or the mutants indicated containing HA tags were incubated or not 24 h after transfection with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 100  $\mu$ g/ml) for 6 h plus the proteasomal inhibitor MG132 (50  $\mu$ M) or the FDA-approved drug Velcade® (bortezomib) (Millennium Pharmaceuticals, Inc) at 2.6 and 5.4  $\mu$ M. From three independent experiments, Velcade® (bortezomib) was able to recover protein expression about 25–40% for A157E and 5–15% for S280L mutants.  $\beta$ -Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

### Chemical strategies to improve expression of MLC1 mutants

Finally, we decided to explore several experimental approaches that could improve mutant expression. First, we consider the possibility that incubation at low temperature or with chemical chaperones such as glycerol could raise mutant protein levels, as has been described in typical folding mutants of other proteins (36,37). In transfected HeLa cells, all the mutations studied, including the mild mutant S246R, increased steady-state values after lowering the temperature to 33°C and addition of glycerol (Fig. 7A). In one of the intermediate mutants, we studied [G59E, (38)], incubation of G59E-transfected HeLa cells at low temperature and with glycerol increased PM values concomitantly, whereas wt MLC1 surface levels were not significantly altered with this treatment (Fig. 7B).

As an another alternative approach, and because the expression of most mutants was increased after blocking proteasomal degradation (Fig. 4A), we explored the possibility of using FDA-approved proteasomal inhibitors like Velcade® (bortezomib) as a possible pharmacological approach in these patients (39). Our first aim was to check whether Velcade® (bortezomib) incubation could reduce mutant degradation after CHX treatment in transfected HeLa cells. As depicted in Figure 7C, Velcade® (bortezomib) partially reduced the degradation of the intermediate mutant A157E and the severe mutant S280L, with a higher efficiency for the intermediate mutant A157E. The house-keeping  $\beta$ -actin protein was used as a loading control.

## DISCUSSION

The present study extends our knowledge on the molecular basis of the defect for mutations that do not disrupt completely the synthesis of full-length MLC1 protein.

Our data indicate that most MLC1 mutants are mainly retained in an intracellular compartment, probably the ER,

as evidenced by the studies with the chimeric protein containing glycosylation sites (MLC1GLYC). Although we do not know whether this chimera is functional, we believe that can be used to follow the intracellular trafficking of MLC1, because it is able to reach the PM and because the introduction of the mutations mirrors what happens in the protein without glycosylation sites. We hypothesized that the ER retention is a consequence of the misfolding caused by the mutations, as suggested by the recovery of protein expression by lowering the temperature or by adding chemical chaperones. Our previous studies indicated that MLC1 forms oligomers *in vivo* in the ER (17). Mutations could impede the correct oligomerization, which may be required for ER exit. Alternatively, mutations could simply disrupt protein structure.

This study also shows that mutants are also targeted to lysosomes after their internalization from the PM, as has been described for mutations in *CFTR* leading to cystic fibrosis (32). This observation supports the hypothesis that, apart from the ER quality control, there is a peripheral quality control mechanism regulating the conformation of PM proteins. We speculate that the proportion of degradation in proteasomes and lysosomes will vary depending on each particular mutation. A minor proportion of wt MLC1 protein is also targeted to lysosomes, probably as a consequence of the overexpression. In summary, we suggest that reduced PM levels are a consequence of increased protein degradation caused by an alteration of mutant protein trafficking.

We have classified the severity of the mutations on the basis of their impact on MLC1 PM protein levels. The lack of detailed clinical data for all the MLC patients limits possible correlations between this biochemical parameter and the phenotype of each patient. Possible genotype–phenotype correlations are also difficult to estimate due to the high intrafamilial phenotypic variability, the slow progression of the disease and the fact that the disease phenotype may worsen abruptly after minor head trauma or intercurrent infections (5). But, as a general impression, patients with truncated pro-

teins are not more severely affected than those patients with missense mutations. This phenotypic correlation can now be explained on the basis of our new data, because we provided evidence that MLC1 protein levels will be reduced in all cases.

Our study has also shown that the measured biochemical severity of each mutation depends on the cell system used to characterize the protein, as was neatly illustrated by the example of the S246R mutant. This mutant has roughly similar surface levels and protein stability to the wt MLC1 protein in *Xenopus* oocytes and transfected cell lines (Figs 1–4), although its protein levels are increased after reducing the temperature and adding glycerol (Fig. 7), which may indicate a minor folding problem. In contrast, surface expression and stability levels fell in primary cell culture of astrocytes (Fig. 5), and protein levels were not even detectable in monocytes from MLC patients harbouring this mutation (Fig. 6C). Possibly, the level of expression of the mutants in each cell system and the performance of the quality control machineries (ER and peripheral) determine the measured severity of each particular mutation.

Remarkably, most of the mutations studied led to attenuated cell surface expression of MLC1. There is an attractive parallelism in other genetic disorders, like cystinuria (40) or Bartter's syndrome (41). In these heterogeneous disorders that affect transport processes through the membrane, mutations that affect the catalytic subunit may affect surface expression or reduce functional activity, whereas mutations that affect the chaperone subunit cause only a reduction in surface expression. Given the hypothesis that the molecular cause of MLC is a defect in ion transport, and since there are still other unidentified MLC-causing genes, we speculate that MLC1 may function as a chaperone-like molecule of other proteins with ion transport activity.

We assumed that lack of expression will be a common feature for MLC patients with mutations in *MLC1*, based on our *in vitro* and *in vivo* data. In fact, in order to finally prove that this is a common defect, we should extend the *in vivo* study to more MLC patients with mutations in the *MLC1* gene. It will also be interesting to study MLC1 protein levels in MLC patients without linkage to the *MLC1* gene (15,16). Meanwhile, we suggest that this simple biochemical assay (Western blot from monocytes) could be used as an additional diagnosis tool.

Although the physiological pathway in which MLC1 operates is still unknown, the observation of a common defect for all the mutants indicates that therapeutic approaches directed at increasing the expression or stability of MLC1 could be beneficial in MLC patients with associated *MLC1* missense mutations. We have shown that the reduction of temperature, treatment with glycerol (this study) and curcumin (17) increased MLC1 expression levels. Furthermore, here we have addressed the effect of the first FDA approved drug that works as a proteasomal inhibitor (Velcade® (bortezomib)) (39), showing positive results in a transfected cell line model. If the mutants retain totally or partially their putative transport or chaperone function, a chemical based-therapy (42,43) could be used to treat MLC, although these results are very preliminary and further work with mouse models containing *MLC1* mutations is needed.

## MATERIALS AND METHODS

### Molecular biology

Constructs were made using recombinant PCR and were then sequenced. The construction of MLC1 with 2 *HA* tags has been described previously (17). To construct an MLC1 glycosylation reporter (MLC1GLYC), we introduced some amino acids from the extracellular loop of the highly glycosylated amino acid transporter LAT-4 (44) between the putative transmembrane domain 3 and 4 (before the MLC1 non-conserved intracellular loop). The amino acid sequence in this region was CKLVNMLKSE...AQDEMPSAIN (flanking residues of the LAT-4 inserted sequence in bold, residues 39 to 87).

### Adenovirus production

Each wild-type or mutant (S246R) *MLC1* cDNA containing two *HA* epitope tags was amplified with two primers bearing attB1 and attB2 gateway recombination sites using *Pfu* Polymerase (Stratagene). PCR products were gel-purified and cloned into the pDONR221 vector using BP clonase (Invitrogen). Correct entry clones were identified by restriction analysis and fully sequenced. Each was recombined using LR clonase (Invitrogen) with the vector pAd/CMV/V5-DEST to construct a packageable vector plasmid. Adenoviruses were obtained according to the ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) protocol. Briefly, constructs were digested with *PacI* (New England Biolabs) and purified to expose the ITRs. HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Twelve hours later, the medium was removed and replaced with fresh DMEM (Biological Industries). Forty-eight hours post-transfection, cells were trypsinized and transferred to a sterile 10 cm tissue culture plate until 80% of visible regions with cytopathic effect were observed (10–13 days post-transfection). Cells and medium were collected to obtain the crude viral lysate. The transducing units per millilitre of each cell lysate were determined by  $\alpha$ -hexon staining-based method (45).

### Rat astrocytes primary culture, transfection and transduction

Purified rat astrocyte cultures were prepared from 1 to 3 days old Sprague Dawley rats (Charles River), as previously described with some modifications (46). Briefly, cerebral cortices were dissected and the meninges were carefully removed in cold sterile PBS 1x+0.3% BSA+0.6% glucose. The tissue was trypsinized for 10 min at 37°C and mechanically dissociated in complete DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Biological Industries), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% glutamine (Invitrogen) plus 40 U/ml DNase I (Sigma)) 10 times through a small bore fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was pelleted and resuspended in fresh complete DMEM, filtered through a 100  $\mu$ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (TPP). When the mixed glial cells reached confluence, contaminating microglia, oligodendrocytes and precursor cells were dislodged by mechanical agitation and removed as previously

described (46). Astrocytes were then trypsinized, plated in poly-D-lysine-coated (Sigma) glass coverslipped in 24-well plates at about 80 000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured for another 3–7 days. Cultured astrocytes were identified by their positive GFAP staining (a typical astrocyte marker, Dako). Their negative staining to class III  $\beta$ -tubulin (TUJ1, a neuronal marker (47), Covance) indicated the absence of neurons. These astrocytes expressed MLC1, as detected by western blot and immunofluorescence staining (data not shown).

Astrocytes were co-transfected with pCDNA3-wt MLC1 and mutants (G59E, A245P, S246R and S280L) together with PH-GFP, to visualize membrane staining (33). Astrocytes were plated on poly-D-lysine-coated (Sigma) glass coverslipped in 24-well plates (TPP) at 60% of confluence. The next day, astrocytes were transfected with lipofectin (Invitrogen) at 1:2 ratio (DNA:lipofectin) in Opti-MEM medium (as described in manufacturer's instructions) and after 3 h, medium was replaced with complete DMEM and incubated 48 h at 37°C. To infect astrocytes with adenovirus, they were then trypsinized and plated at 5·10<sup>5</sup> cells on 35 cm plates. The next day, wt MLC1 or S246R mutant adenoviruses were added at a MOI of 2, and kept overnight at 37°C. Medium was then removed, new fresh medium was added and cells were incubated at 37°C until they were processed (24–48 h).

### Immunological procedures

Immune sera against one human MLC1 synthetic peptide, corresponding to the first amino acids of the N terminal region of the protein (peptide: TQEPFREELAYDRMP), were raised in rabbits using the services provided by Eurogentec. The peptide was coupled to keyhole limpet haemocyanin via a cysteine residue that has been added to the C-terminal region, mimicking its N-terminal position. After three boosts of immunization, the antisera were affinity purified using the peptide covalently coupled to Sulpholink (Pierce). The polyclonal antibody was tested by immunoblotting, immunofluorescence and immunoprecipitation on transfected HeLa cells expressing human MLC1 and on non-transfected cells.

Transfected astrocytes were fixed for 15 min with 3% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS, incubated 10 min in PBS containing 50 mM ammonium chloride, 10 min in PBS containing 20 mM glycine and blocked and permeabilized for 2 h at RT with 10% FBS in PBS 0.1% Triton X-100. Subsequently, coverslips were incubated with primary antibody [anti-*HA* (3F10) at 1:500 (Roche) diluted in 10% FBS in PBS 0.1% Triton X-100] overnight at 4°C. After three washings, they were incubated with TRITC-conjugated donkey anti-rat (Jackson) in PBS 0.1% Triton X-100 at RT for 2 h. Finally, they were washed in PBS prior to mounting in Vectashield medium (Vector Laboratories) with DAPI (Sigma). Images were acquired using an Olympus DSU spinning disk confocal microscopy.

### Measurement of surface expression by luminescence

*HA* antibodies (3F10, Roche) and chemiluminescence techniques were used to measure surface expression in MLC1-injected *Xenopus* oocytes, MLC1-transfected HeLa cells and MLC1-infected astrocytes, as previously described

(19). The mutant P294L (Fig. 1A) was studied only by measuring total protein expression levels, because this mutation disrupted the extracellular *HA* tag (see Materials and Methods).

### Real-time PCR

MLC1 expression in one brain sample was compared to three lymphoblast cell lines (VU0046, VU0047 and VU0048). Duplicate samples were analysed. The quantitative PCR experiments were performed using an ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems). Transcript-specific primers were generated with Primer Express software (Applied Biosystems) and designed to bind exon–exon boundaries to prevent genomic DNA amplification. The PCR reaction was carried out in a volume of 10  $\mu$ l, using SYBR green PCR mix, 3.0  $\mu$ M primers and 0.1  $\mu$ g cDNA. The PCR program was applied following manufacturer's guidelines.

The cycle of threshold value (Ct) was used to calculate the relative expression level of MLC1 and was normalized to the transcripts for the housekeeping genes GADPH or  $\beta$ -actin. The Ct value is defined as the cycle number at which fluorescent emission reaches a fixed threshold during the exponential phase of amplification. The Ct value is inversely correlated with the original amount of mRNA. The resulting gene expression is given in  $\Delta$ Ct, i.e. the mean Ct value corrected for a housekeeping gene.

### Vesicular pH measurement of MLC1-containing endocytic organelles

The pH of endocytic vesicles containing MLC1 was measured by fluorescence ratio imaging of internalized anti-*HA* antibody (Covance) complexed with FITC-conjugated goat anti-mouse Fab antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Cells were incubated with the primary and secondary antibodies in tissue culture medium at 37°C for 1–3 h, antibodies were chased for 30 min in antibody free medium and then washed with NaKH medium (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Hepes, 10 mM glucose, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.3), and imaged on a microscope (Axiovert 100; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) at 35°C, equipped with a Hamamatsu ORCA-ER 1394 (Hamamatsu) cooled CCD camera and a 63 $\times$  NA 1.4 Planachromat objective. Image acquisition and analysis were performed with MetaFluor<sup>®</sup> software (Molecular Devices). Images were acquired at 490  $\pm$  5 nm, and 440  $\pm$  10 nm excitation wavelengths, using a 535  $\pm$  25 nm emission filter. *In situ* calibration curves were obtained by clamping the vesicular pH between 4.5 and 7.0 in K<sup>+</sup>-rich medium (135 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM Hepes or 20 mM MES, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, containing 10  $\mu$ M nigericin, 10  $\mu$ M monensin, and 5  $\mu$ M carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazon) and recording the fluorescence ratio of cells loaded FITC-Fab and anti-*HA* antibody in MLC1 expressors. The fluorescence ratios as a function of extracellular pH provided the standard curve for the pH determination of MLC1-containing vesicles. In addition, one point calibration was done on each coverslip by clamping the vesicular pH to 6.5. Mono- and multi-peak Gaussian fits for vesicular pH were performed with Origin 7.0 software



(OriginLab® Corporation). The average pH of each type of vesicle population was calculated as the arithmetic mean of the data and was identical to the Gaussian mean, on the basis of single-peak distribution fitting, except for MLC1 and S246R and N141K mutants, in which two or three-peak Gaussian distribution analysis was performed.

### Human brain tissue and human monocytes

A brain biopsy containing neocortex and subcortical white matter was obtained from a MLC patient (EL18) for diagnostic purposes (35); frozen tissue was used for the study. Although the mutations in this patient are not known, the family was informative and showed linkage to the *MLC1* locus. Quantitative real-time PCR analysis confirmed decreased *MLC1* expression in lymphoblasts of this patient (26). Frozen human control brain tissue specimens, consisting of neocortex and white matter, were obtained at autopsy from patients without neurological disease and neuropathologic abnormalities. During life, the patients or their next of kin had given consent for autopsy and the use of brain tissue for research purposes. Immunohistochemistry was performed with antibodies against the *MLC1* protein and GFAP (21).

Mononuclear cells were isolated from peripheral blood samples by centrifugation on a Ficoll-Hypaque (Seromed) gradient. Lymphocytes and monocytes were isolated by overnight attachment to a dish cell culture.

### FUNDING

This study was supported in part by FIS PI04/1680 (R.E.), FIS PI04/1692 (V.N.), FIS PI04/2433 (A.M.), SAF2006-01631 (R.E.), Fundación Ramon Areces project (R.E.), ELA Foundation 2007-017C4 project (R.E.), BFU2004-01154 (F.A.). G.C.S., I.B. and M.S.v.d.K. are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (program grant 903-42-097, TOP grant 9120.6002), the Hersenstichting (grants 10F02(2).02, 13F05.04 and 15F07.30) and the Optimix Foundation for Scientific Research. G.L.L. was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), National Institutes of Health (NIH, NIDDK) and the Canadian Foundation for Innovation. G.L.L. is a holder of a Canada Research Chair. R.E. was a researcher from the *Programa Ramón y Cajal* of the Spanish Ministry of Science and Technology.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elon Pras for providing us with lymphoblast cell lines from MLC patients; Ignacio Pascual-Castroviejo for blood from MLC patients; Soledad Alcántara, Miguel Morales and Xavier Gasull for help with primary astrocyte cultures; Joan Gil, Mercè de Frias and Felix Rueda for PBLs isolation; Artur Llobet for the gift of the PHGFP plasmid; Manel Cascalló for help with adenoviral production; Millennium Pharmaceuticals Inc. for the gift of Velcade® (bortezomib) and Michael Maudsley for editorial support.

**Conflict of Interest statement.** The authors declare no conflict of interest.

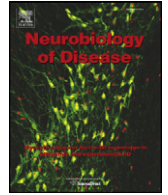
### REFERENCES

- Schiffmann, R. and Boespflug-Tanguy, O. (2001) An update on the leukodystrophies. *Curr. Opin. Neurol.*, **14**, 789–794.
- Schiffmann, R. and van der Knaap, M.S. (2004) The latest on leukodystrophies. *Curr. Opin. Neurol.*, **17**, 187–192.
- Goutieres, F., Bouloche, J., Bourgeois, M. and Aicardi, J. (1996) Leukoencephalopathy, megalencephaly, and mild clinical course. A recently individualized familial leukodystrophy. Report on five new cases. *J. Child Neurol.*, **11**, 439–444.
- Topcu, M., Saatci, I., Topcuoglu, M.A., Kose, G. and Kunak, B. (1998) Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Dev.*, **20**, 142–153.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F. and Valk, J. (1995) Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.*, **37**, 324–334.
- Singhal, B.S., Gursahani, R.D., Udani, V.P. and Biniwale, A.A. (1996) Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr. Neurol.*, **14**, 291–296.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G. and Tortori Donati, P. (1995) Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology*, **37**, 679–686.
- Riel-Romero, R.M., Smith, C.D. and 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.
- Singhal, B.S., Gorospe, J.R. and Naidu, S. (2003) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *J. Child Neurol.*, **18**, 646–652.
- Pascual-Castroviejo, I., van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., Garcia-Segura, J.M., Gutierrez-Molina, M. and Pascual-Pascual, S.I. (2005) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurologia*, **20**, 33–40.
- Saijo, H., Nakayama, H., Ezoe, T., Araki, K., Sone, S., Hamaguchi, H., Suzuki, H., Shiroma, N., Kanazawa, N., Tsujino, S. *et al.* (2003) A case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der knaap disease): molecular genetic study. *Brain Dev.*, **25**, 362–366.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B. *et al.* (2001) Mutations of *MLC1* (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 831–838.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C. and van der Knaap, M.S. (2002) Identification of novel mutations in *MLC1* responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.*, **110**, 279–283.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Oztug, M. and Seboun, E. (2000) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 733–739.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S. and Kohler, W. (2003) Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics*, **34**, 215–218.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A. *et al.* (2003) Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology*, **61**, 534–537.
- Tejido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004) Localization and functional analyses of the *MLC1* protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
- Meyer, J., Huberth, A., Ortega, G., Syagailo, Y.V., Jatzke, S., Mossner, R., Strom, T.M., Ulzheimer-Teuber, I., Stober, G., Schmitt, A. *et al.* (2001) A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is

- associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol. Psychiatry*, **6**, 302–306.
19. Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B. and Navon, R. (2004) Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **125B**, 31–37.
  20. Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
  21. Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C. and van der Knaap, M.S. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412–419.
  22. Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R. and Lesch, K.P. (2003) The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia*, **44**, 283–295.
  23. Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T.C. and Aloisi, F. (2008) Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin–glycoprotein complex. *Mol. Cell. Neurosci.*, **37**, 480–493.
  24. Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J.C., van Horsen, J., Dinopoulos, A., Bove, K.E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F. *et al.* (2007) MLC1 is associated with the dystrophin–glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.*, **114**, 403–410.
  25. Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O. *et al.* (2006) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 292.
  26. Ijja Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C. and Pronk, J.C. (2006) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 505–512.
  27. Gorospe, J.R. and Maletkovic, J. (2006) Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, **12**, 113–122.
  28. Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C. and Collins, F.S. (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in xenopus oocytes. *Science*, **254**, 1797–1799.
  29. Farinha, C.M., Penque, D., Roxo-Rosa, M., Lukacs, G., Dormer, R., McPherson, M., Pereira, M., Bot, A.G., Jorna, H., Willemsen, R. *et al.* (2004) Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J. Cyst. Fibros.*, **3** (Suppl. 2), 73–77.
  30. Laing, J.G., Tadros, P.N., Westphale, E.M. and Beyer, E.C. (1997) Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp. Cell Res.*, **236**, 482–492.
  31. Barriere, H., Nemes, C., Du, K. and Lukacs, G.L. (2007) Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3952–3965.
  32. Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K.G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H. *et al.* (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J. Cell Biol.*, **164**, 923–933.
  33. Halet, G. (2005) Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol. Cell.*, **97**, 501–518.
  34. Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K. and Tabata, S. (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.
  35. van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F. and Valk, J. (1996) Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.*, **92**, 206–212.
  36. Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S. and 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.
  37. Burrows, J.A., Willis, L.K. and Perlmutter, D.H. (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 1796–1801.
  38. Ben-Zeev, B., Levy-Nissenbaum, E., Lahat, H., Anikster, Y., Shinar, Y., Brand, N., Gross-Tzur, V., MacGregor, D., Sidi, R., Kleta, R. *et al.* (2002) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews. *Hum. Genet.*, **111**, 214–218.
  39. Bonuccelli, G., Sotgia, F., Capozza, F., Gazzo, E., Minetti, C. and Lisanti, M.P. (2007) Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell Cycle*, **6**, 1242–1248.
  40. Chillaron, J., Estevez, R., Samarzija, I., Waldegger, S., Testar, X., Lang, F., Zorzano, A., Busch, A. and Palacin, M. (1997) An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9543–9549.
  41. Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F. and Jentsch, T.J. (2001) Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature*, **414**, 558–561.
  42. Cohen, F.E. and Kelly, J.W. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*, **426**, 905–909.
  43. Morello, J.P., Petaja-Repo, U.E., Bichet, D.G. and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 466–469.
  44. Bodoy, S., Martin, L., Zorzano, A., Palacin, M., Estevez, R. and Bertran, J. (2005) Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12002–12011.
  45. Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J.R. and Alemany, R. (2006) Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther.*, **13**, 696–705.
  46. McCarthy, K.D. and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.*, **85**, 890–902.
  47. Sergent-Tanguy, S., Chagneau, C., Neveu, I. and Naveilhan, P. (2003) Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J. Neurosci. Methods*, **129**, 73–79.

**Artículo aceptado en Marzo de 2011 en la  
revista NEUROBIOLOGY OF DISEASE**





## Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: A MLC disease cell model

Anna Duarri<sup>a,c</sup>, Miguel Lopez de Heredia<sup>d,i,1</sup>, Xavier Capdevila-Nortes<sup>a,1</sup>, Margreet C. Ridder<sup>e</sup>, Marisol Montolio<sup>a,c</sup>, Tania López-Hernández<sup>a</sup>, Ilja Boor<sup>e</sup>, Chun-Fu Lien<sup>f</sup>, Tracy Hagemann<sup>g</sup>, Albee Messing<sup>g</sup>, Dariusz C. Gorecki<sup>f</sup>, Gert C. Scheper<sup>e</sup>, Albert Martínez<sup>h</sup>, Virginia Nunes<sup>b,d,i</sup>, Marjo S. van der Knaap<sup>e</sup>, Raúl Estévez<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-750, Spain

<sup>d</sup> Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-730, ISCIII, Spain

<sup>e</sup> Department of Pediatrics/Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

<sup>f</sup> Institute of Biomedical and Biomolecular Sciences, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, UK

<sup>g</sup> University of Wisconsin-Madison, WI, USA

<sup>h</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Institute for Research in Biomedicine (IRB), Spain

<sup>i</sup> Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 October 2010

Revised 7 March 2011

Accepted 14 March 2011

Available online 3 April 2011

#### Keywords:

Astrocyte

Junctions

Leukodystrophy

Volume

### ABSTRACT

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy, in the majority of cases caused by mutations in the *MLC1* gene. MRI from MLC patients shows diffuse cerebral white matter signal abnormality and swelling, with evidence of increased water content. Histopathology in a MLC patient shows vacuolation of myelin, which causes the cerebral white matter swelling. MLC1 protein is expressed in astrocytic processes that are part of blood- and cerebrospinal fluid-brain barriers. We aimed to create an astrocyte cell model of MLC disease. The characterization of rat astrocyte cultures revealed MLC1 localization in cell–cell contacts, which contains other proteins described typically in tight and adherent junctions. MLC1 localization in these contacts was demonstrated to depend on the actin cytoskeleton; it was not altered when disrupting the microtubule or the GFAP networks. In human tissues, MLC1 and the protein *Zonula Occludens 1* (ZO-1), which is linked to the actin cytoskeleton, co-localized by EM immunostaining and were specifically co-immunoprecipitated. To create an MLC cell model, knockdown of MLC1 in primary astrocytes was performed. Reduction of MLC1 expression resulted in the appearance of intracellular vacuoles. This vacuolation was reversed by the co-expression of human MLC1. Re-examination of a human brain biopsy from an MLC patient revealed that vacuoles were also consistently present in astrocytic processes. Thus, vacuolation of astrocytes is also a hallmark of MLC disease.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) (OMIM 604004) is an unusual leukodystrophy (van der Knaap et al., 1995a, 1995b) characterized by infantile onset macrocephaly, diffuse signal abnormality, swelling of the cerebral white matter and the presence of cysts in the anterior temporal regions (van der Knaap et al., 1995a, 1995b). Diagnosis is based on clinical and MRI

criteria. A brain biopsy from an MLC patient showed that myelin was vacuolated (van der Knaap et al., 1996).

The first disease chromosome locus was found in 2000 (Topcu et al., 2000) and the first disease gene in 2001 (Leegwater et al., 2001). Mutations in the *MLC1* gene are found in approximately 80% of the MLC patients (Ilja Boor et al., 2006; Leegwater et al., 2001, 2002; Montagna et al., 2006); there is evidence that other unknown genes are also involved (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003). MLC1 (the protein product of *MLC1*) is an oligomeric membrane protein with some degree of homology to ion channels (Leegwater et al., 2001; Teijido et al., 2004). Mutations found in MLC patients reduce MLC1 protein expression (Duarri et al., 2008). The physiological role of MLC1 is unknown. Based on the myelin vacuolation present in MLC patients and the low homology of MLC1 to ion channels, it has been suggested that MLC1 could have a role in ion transport processes

\* Corresponding author at: Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Pavelló de Govern, C/Feixa llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

E-mail address: [reestevez@ub.edu](mailto:reestevez@ub.edu) (R. Estévez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).



linked to water movements. Unfortunately, functional evidence is lacking, because no ion channel activity has been detected after expression of MLC1 in heterologous systems (Kaganovich et al., 2004; Teijido et al., 2004).

Within the brain, MLC1 is located in two populations: neurons and astrocytes (Boor et al., 2005; Schmitt et al., 2003; Teijido et al., 2004, 2007). In astrocytes, MLC1 is mainly present in the processes that are in contact with blood- and cerebrospinal fluid-brain barriers (CSF). Electron microscopic immunohistochemistry indicated that, in mouse tissue, MLC1 is located in astrocyte–astrocyte contacts and not in astrocyte–endothelial contacts (Teijido et al., 2007).

Here, we used rat primary astrocytes to understand the pathophysiological mechanisms of MLC. First, we characterized the endogenous MLC1 protein; and second, we reduced MLC1 expression and analyzed the consequences of this reduction. We then re-examined the human MLC brain tissue by EM to confirm the relevance of our findings.

## Materials and methods

### *Animal experimentation and human samples*

All the animal experimental protocols have been approved by the Animal Care and Ethics Committee of the University of Barcelona and conformed to the rules set by the Government of Catalunya.

Human brain samples have been examined, registered, classified and stored following general consensus of the European Brain Bank Network at the Institute of Neuropathology Brain Bank at the Bellvitge Hospital. The anonymized register included age and gender, minimal clinical data set, post-mortem delay and pH of the brain. Neuropathological diagnosis covered up to four neuropathological diagnoses of the primary disease and associated pathologies. Stage of the disease following internationally-accepted nomenclature is recorded in every case.

MLC brain biopsy material was obtained for diagnostic purposes, as has been described previously (van der Knaap et al., 1996).

### *Immunological procedures*

Immune sera against N-terminal mouse MLC1 and the N4 anti-N-terminus of human MLC1 antibody were generated and characterized previously (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004, 2007).

### *Primary culture and adenoviral transduction*

Rat and mouse primary astrocyte cultures were prepared as described previously with some modifications (Duarri et al., 2008). Briefly, cortex and hippocampus were removed from newborn Sprague Dawley rats or OF1 mice (Charles River). Rat astrocyte cultures were prepared from 1 to 3 days old rats while mouse astrocyte cultures were prepared from 0 to 1 day old OF1 mice. Cerebral cortices were dissected and the meninges were carefully removed in cold sterile 0.3% BSA, 0.6% glucose in PBS. The tissue was trypsinized for 10 min at 37 °C and mechanically dissociated through a small bore fire-polished Pasteur pipette in complete DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biological Industries), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% glutamine (Invitrogen) plus 40 U/ml DNase I (Sigma)). The cell suspension was pelleted and re-suspended in fresh complete DMEM, filtered through a 100- $\mu$ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (TPP). When the mixed glial cells reached confluence, contaminating microglia, oligodendrocytes and precursor cells were dislodged by mechanical agitation and removed as previously described (McCarthy and de Vellis, 1980). Astrocytes were plated in 6-well plates, at density of 4 · 10<sup>5</sup> cells per well, or in poly-D-lysine-coated cover slips at 7.5 · 10<sup>4</sup> cells in 24-well plates. Medium was changed every 3 days. In order to obtain astrocyte cultures arrested in the cell cycle, medium was

replaced and cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) (2  $\mu$ M) was added. Similarly, Fluo-uridine/uridine or dBAMPc were added at 20/50  $\mu$ g/ml or 250  $\mu$ M, respectively. Cultured astrocytes were identified by their positive GFAP (Glial Fibrillary acid protein) staining (Dako), being >95% of cells GFAP positive.

Treatment of cells with colchicine (10  $\mu$ g/ml, Sigma) and Taxol (10  $\mu$ M, Sigma) was performed during 20 h (Sorci et al., 1998), while incubation with cytochalasin-D (10  $\mu$ M, Sigma) was performed during 2 h (Nicchia et al., 2008).

Construction of adenovirus expressing HA-tagged human MLC1 and transduction of astrocytes were previously described (Duarri et al., 2008).

### *Immunofluorescence studies*

Tissue immunohistochemistry was performed as previously described (Teijido et al., 2004, 2007).

For immunofluorescent staining of cells, these were fixed with PBS containing 3% paraformaldehyde for 15 min, blocked and permeabilized with 10% FBS and 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 h at room temperature (RT). Primary antibodies were diluted in the same solution and incubated over-night at 4 °C. Antibodies used were already described Anti-mouse MLC1 and anti-human MLC1 (1:50), anti-ZO-1 (Zonula occludens 1) (1:100; Zymed), anti-N-Cadherin (1:100; Sigma), anti- $\beta$ -Catenin (1:100; BD Transduction Lab.), anti-Occludin (1:100; Zymed), anti-Ezrin (1:200; Abcam), anti-Vinculin (1:1000; Zymed), anti-Connexin 43 (1:50; Zymed), Phalloidin-FITC (1:1000; Sigma), anti- $\beta$ -Tubulin (1:1000; Chemicon), anti-GFAP (1:2000; Chemicon), anti-HA (haemagglutinin) 3 F10 (1:500; Roche), anti- $\beta$ -Dystroglycan (1:100; Novacastra), anti- $\alpha$ -Dystroglycan (1:30; Upstate), anti-Syntrophin (1:80; Affinity Bioreagents), and anti- $\beta$ -Dystrobrevin (1:200; Ambrosini's lab). Cells were washed and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies: Alexa-488 anti-mouse, Alexa-568 anti-rabbit, Alexa-568 anti-mouse and Alexa-488 anti-rabbit (1:500 dilution; Invitrogen). Coverslips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) with 1.5  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma) and visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal microscope. Colocalization experiments were analyzed using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### *Co-immunoprecipitation and Western blot*

Rat brains were homogenized in immunoprecipitation buffer: 150 mM NaCl in PBS containing 1% Dodecyl-maltoside and protease inhibitors: 1  $\mu$ M Pepstatin and Leupeptin, 1 mM Aprotinin and PMSF using a dounce homogenizer. Tissue lysates were incubated for 1 h at 4 °C and centrifuged (5 min at 3000  $\times$ g) to discard large debris, and proteins were quantified by the BCA kit (Pierce). 1–2 mg of antibodies against mouse MLC1, an irrelevant IgG or BSA was covalently linked to an agarose matrix as described in manufacturer's instructions (AminoLink Plus Immobilization Kit, Pierce). Antibody-linked agarose matrix was equilibrated in immunoprecipitation buffer and tissue lysate was added in a ratio of 10  $\mu$ l (corresponding to about 10  $\mu$ g of antibody):100  $\mu$ g of protein and incubated 2 h at 4 °C. Flowthrough was recovered by centrifugation and pellet was washed in the same buffer. Immunoprecipitates were eluted in SDS loading sample buffer for 15 min at 60 °C.

For Western blot studies, astrocyte lysates were prepared by homogenization of cells in PBS containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors: 1  $\mu$ M Pepstatin and Leupeptin, 1 mM Aprotinin and PMSF, incubated for 1 h at 4 °C and centrifuged. Supernatants were quantified using BCA kit (Pierce) and mixed with SDS loading sample buffer. Western-blot analysis was performed as described (Teijido et al., 2004). Membranes were incubated with primary antibodies: anti-MLC1 (1:100) and anti- $\beta$ -Actin (1:10000, Sigma) and secondary antibodies: HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse (1:10000;

Jackson), respectively. Quantification of Western blots was performed by ImageJ.

### Electron microscopy

Small human cerebellum samples were obtained post-mortem (Bellvitge Hospital), fixed in 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer and processed. They were cryoprotected gradually in sucrose and cryofixed by immersion in liquid propane. Freeze substitution was performed at  $-90^{\circ}\text{C}$  during 3 days in an "Automatic Freeze Substitution System" (AFS, Leica), using methanol containing 0.5% uranyl acetate as substitution medium. Infiltration was carried out in Lowicryl HM20 at  $-50^{\circ}\text{C}$  and then polymerized with UV lamps. Ultrathin sections were collected and processed for a post-embedding immunostaining. Samples were incubated with rabbit anti-N4-human MLC1 (1:10) antiserum. For double immunostaining, grids were incubated with rabbit anti-N4-human MLC1 (1:10) and mouse anti-ZO-1 (1:10). The secondary antibodies were 18 nm gold-conjugated goat anti-rabbit (British Biocell International; 1:20) and 12 nm colloidal gold-coated goat anti-mouse (British Biocell International; 1:20). In control experiments, the primary antibodies were omitted – no immunogold labeling occurred under these conditions.

MLC brain biopsy material was obtained from the right frontal region in a patient at the age of 13 years for diagnostic purposes (van der Knaap et al., 1996). Ultra-thin sections were collected on Formvar-coated copper grids, stained with lead citrate and uranyl-acetate, and examined by electron microscope (JEOL1010).

### RNA interference

RNAi entry-clone (Gateway, Invitrogen) vectors were prepared using the Block-it PolIII miR RNAi EmGFP expression vector kit following manufacturer's instructions. The sequence of the oligos used was: shRNA Scrambled (negative control): 5'aaatgtactgcgcgtggagacgtttggc-cactgactgacgtctccacgcagctacatt3'; shRNA756 (against rat MLC1): 5'tgcacagcgcaataatccatgtttggcactgactgacatggattatgcgctgtgca3'; and shRNA905 (against rat MLC1): 5'ttcagatcaattgcatccagttttggcactgactgactggatgattgatcctgaa. Entry clones were recombined using LR clonase into the vector pAdVDEST-CMV/V5. Adenoviruses were produced and titrated using flow cytometry detecting the EmGFP which is expressed together with the shRNA.

### Real-time PCR

Total RNA was prepared from one 10 cm-culture plate using NucleoSpin RNA/Prot (Macherey–Nagel) as indicated by the manufacturer. RNA concentration was determined in a Nanodrop spectrophotometer. All samples had an A260/A280 ratio  $>1.8$ . RIN value was obtained with the RNA 600-nano (Agilent) following manufacturer instructions and calculated with 2100 Expert Software B.02.07 (Patch 01). All RNA samples were above 8. RNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

800–1000 ng of total RNA were reverse-transcribed with Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche) following manufacturer instructions at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min followed by  $50^{\circ}\text{C}$  for 60 min, using random hexamers as primers. cDNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . qPCR was performed with Lightcycler 480 probes master kit (Roche) following manufacturer instructions in a final volume of 10  $\mu\text{l}$ , with cDNA at 1:50 dilution. The primers and UPL-probes used were designed with the ProbeFinder version 2.45 (Roche) by the on-line application (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/upl/index.jsp?id=UPO30000>) considering exon spanning and trying to cover all splice variants. qPCR was run in a LightCycler 480 II on 384-well plates. Gene expression was normalized against ACTB ( $\beta$ -Actin) and efficiency curves were used for each of the analyzed genes. All amplifications were within the linear range. Data came from 4 different astrocyte preparations.

Means of triplicates were used for each analysis. The standard deviation of the triplicates was 0.2 or lower. Data analysis was performed using LightCycler 480SW 1.5 software (Roche), MS-Access 2010 and MS-Excel 2010. Outliers and extremes were identified with SPSS v.12 and removed from the analysis. Significance was calculated using a Bootstrap method (Cleries et al., submitted). All primers used are presented in Supplementary Table 1.

## Results

### Expression of MLC1 in primary astrocyte cultures

Previous studies on brain tissue identified MLC1 in astrocyte-astrocyte plasma membrane contact regions in Bergmann glia and astrocytic processes surrounding blood vessels (Tejido et al., 2007). We aimed to study the role of MLC1 in astrocyte physiology to understand the molecular pathogenesis of MLC. In primary rat astrocytes, endogenous MLC1 was detected mostly in a diffuse intracellular localization through the cytoplasm. Since expression of other transporters or channels in astrocytes depends on the metabolic state of the cell (Ferroni et al., 1997), we analyzed MLC1 expression and localization in astrocyte cultures treated with compounds that block cell proliferation and/or cause cell differentiation (see Methods).

Increased protein expression was detected in arrested astrocyte long-term cultures (Fig. 1A). In these cells, MLC1 localization began to appear at the plasma membrane after 1 week (Fig. 1B), and it was clearly detected in astrocyte processes and junctions after 3 weeks in culture (Fig. 1C).

In order to clarify in which type of junctions MLC1 is located, we performed double immunofluorescence studies using different protein markers related to cell junctions or adhesion. A high degree of co-localization was observed between MLC1 and components of tight junctions such as *Zonula Occludens 1* (ZO-1) (Fanning and Anderson, 2009) (Fig. 1D) and Occludin (Hirase et al., 1997) (Fig. 1E). Similarly, there was a high degree of co-localization with components of adherent junctions, such as  $\beta$ -Catenin (Perego et al., 2002) (Fig. 1F). Connexin 43 (Cx43), a typical component of astrocytic gap junctions (Rouach et al., 2000) co-localized with MLC1 partially (Fig. 1G); while MLC1 was distributed along the membrane protrusion joining two cells, Cx43 was localized in discrete spots through the membrane protrusion. Vinculin, a typical marker of focal adhesions (Kalman and Szabo, 2001) (Fig. 1H) and Ezrin, a protein located in developing astrocyte processes (Derouiche and Frotscher, 2001), did not co-localize with MLC1 (Fig. 1I). Similar co-localization patterns were found in mouse astrocytes (data not shown).

### Relationship between MLC1 localization and the cytoskeleton

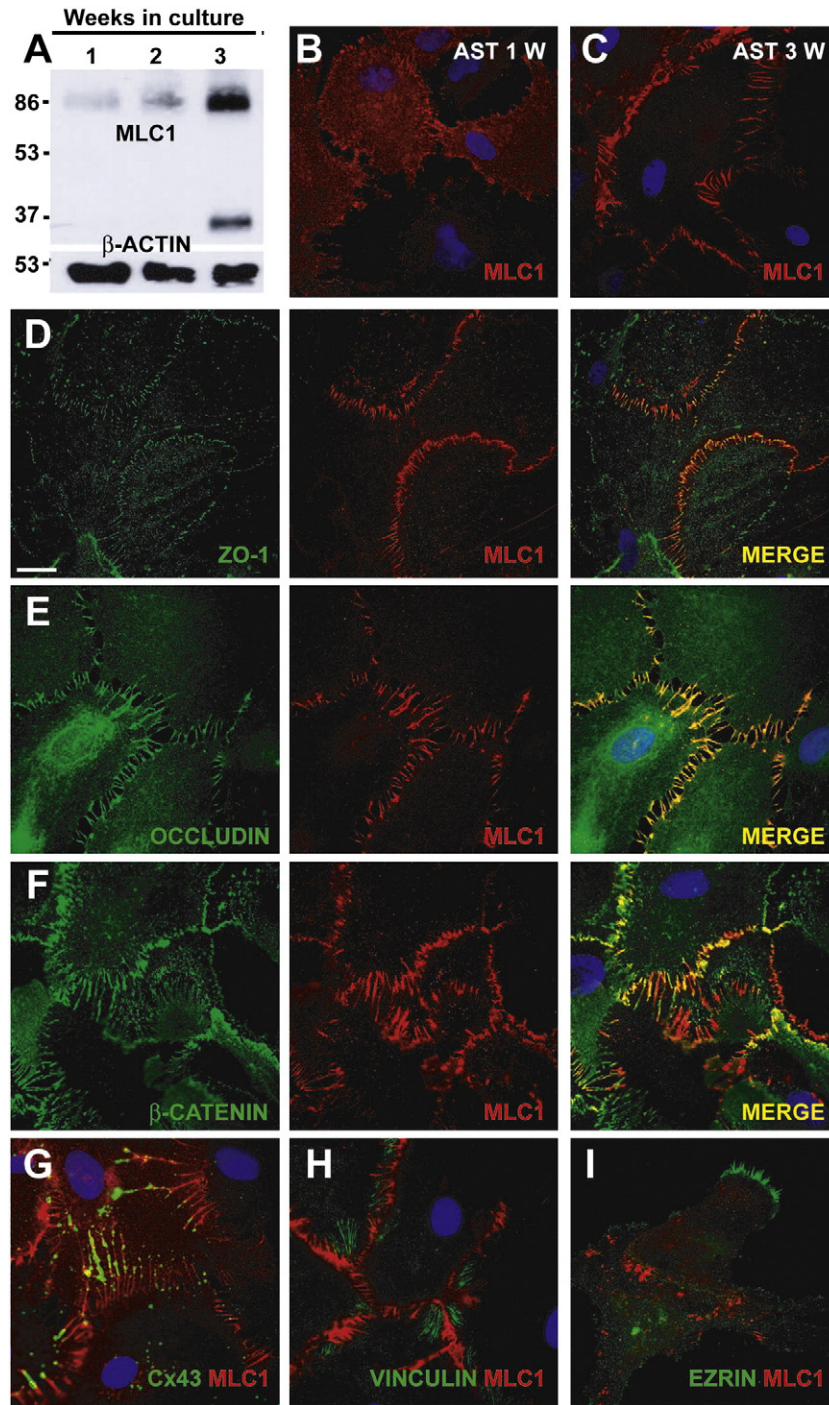
Next, we asked whether cytoskeleton could play a role in the localization of MLC1. For this, we used double immunostaining of MLC1 and markers of cytoskeletal elements combined with chemical and genetic inhibitors to perturb specific types of network filaments.

As shown in Fig. 2A, phalloidin-stained actin filaments were present in MLC1 positive astrocyte junctions. Partial disruption of the actin network with low concentrations of cytochalasin-D (cyt-D) caused cell shrinkage without causing disturbances in MLC1 localization (Fig. 2B). High concentrations of Cyt-D completely abolished MLC1 localization in these junctions (Fig. 2C).

In contrast, microtubules (stained with  $\beta$ -tubulin) were not present in MLC1-positive junctions (Fig. 2D), nor was MLC1 localization changed after microtubule disruption caused by a treatment with colchicine (Fig. 2E), or microtubule stabilization using the inhibitor taxol (Fig. 2F).

Regarding intermediate filaments, some colocalization of MLC1 and GFAP was detected within these astrocyte junctions (Fig. 2G). Transfection of cells with constructs of GFAP fused to GFP (green fluorescence protein) containing a dominant mutation (p.Arg239Cys)





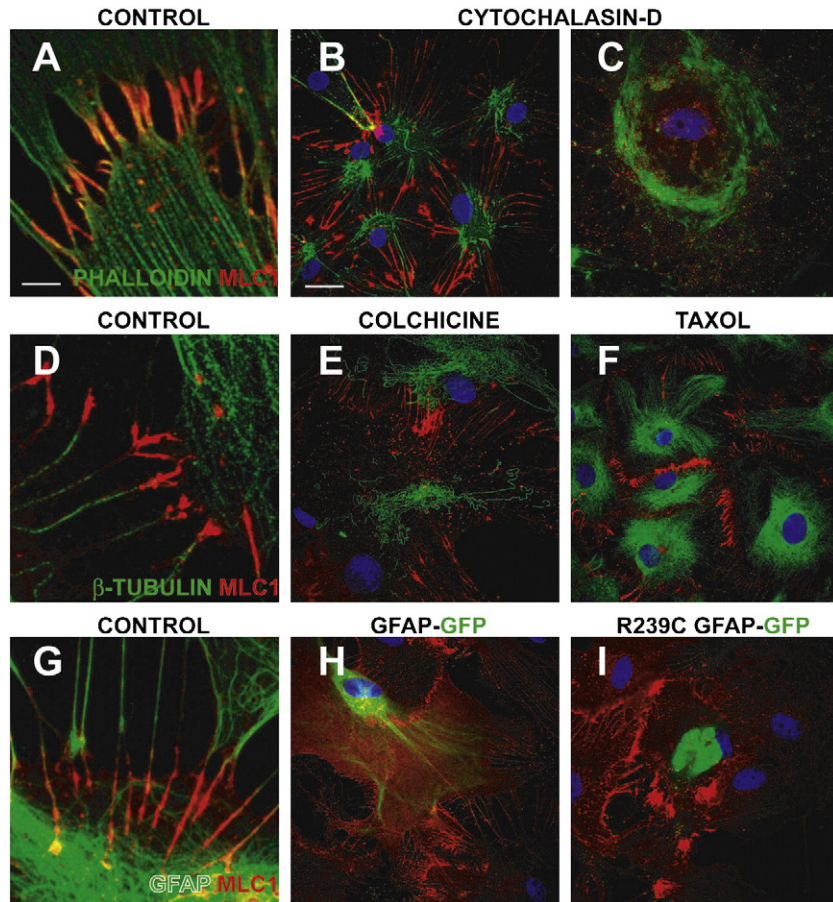
**Fig. 1.** Characterization of MLC1 expression in rat primary astrocyte cultures. (A) MLC1 expression analyzed by Western blot in extracts obtained from rat cortex primary astrocyte cultures arrested with AraC after 1, 2 or 3 weeks in culture. The expression of MLC1 increased with time in culture. MLC1 is detected mainly as a dimer and as a monomer.  $\beta$ -actin was used as a loading control. (B and C) Immunocytochemistry of MLC1 (red) in cultures of arrested astrocytes. After 1 week in culture (B), MLC1 had a diffuse cytoplasmic labeling but also localized to contacts between astrocytes. After 3 weeks (C), MLC1 was clearly located in astrocyte–astrocyte processes. (D–F) Double labeling of MLC1 (red) with tight junction proteins ZO-1 (D) and Occludin (E), and with the adherent junction protein  $\beta$ -Catenin (F) (all in green), showed a large degree of co-localization (MERGE, in yellow). (G) Double immunocytochemistry experiments with Cx43, a typical gap astrocytic junction protein, showed partial co-localization with MLC1. (H–I) No co-localization was observed between MLC1 and Vinculin (H) (a typical marker of focal adhesions) and (I) Ezrin (a marker of growing astrocyte processes). Scale bar: 20  $\mu$ m.

found in Alexander disease is known to disorganize astrocyte intermediate filaments formed by GFAP (Mignot et al., 2007). In astrocytes transfected with the wild-type GFAP or the GFAP R239C dominant mutant, MLC1 localization was unchanged in astrocyte junctions. Moreover, MLC1 localization was not altered in a mouse model of Alexander disease (Hagemann et al., 2006) (Supplementary Fig. 1A and B) or in a human brain from a patient with Alexander

disease (de novo c.1246C>T/p.Arg416Trp mutation in GFAP) (Supplementary Fig. 1C).

#### Interaction of MLC1 with ZO-1

These results suggest that MLC1 localization is mainly dependent on an intact actin filament network. We reasoned that localization of MLC1



**Fig. 2.** Influence of the cytoskeleton on MLC1 localization in astrocytes. (A–C) *Actin cytoskeleton.* Rat primary quiescent astrocytes stained with MLC1 (red) and phalloidin (green), which stains actin filaments (A). Actin cytoskeleton depolymerization with Cytochalasin-D at 5 or 10  $\mu\text{M}$  for 2 h (B and C, respectively) caused alteration of cell morphology and, at the highest drug concentration, a complete delocalization of MLC1. (D–F) *Microtubule filaments.*  $\beta$ -tubulin (green), did not co-localize with MLC1 (D). Colchicine (tubulin inhibitor) treatment (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (E) for 20 h or (F) with 10  $\mu\text{M}$  taxol (tubulin stabilizer) for 20 h triggered changes in the tubulin network, but no apparent change was observed in the localization pattern of MLC1. (G–I) *Intermediate filaments.* GFAP (green) intermediate filaments showed co-localization with MLC1 (G). Transfection of human GFAP-EmGFP fusion protein (H) or the dominant mutant R239C GFAP found in Alexander disease (I) did not cause MLC1 delocalization from cell–cell contacts. Three independent experiments gave similar results. Scale bar A, D and G: 2  $\mu\text{m}$ . Scale bar for all other figures: 20  $\mu\text{m}$ .

in these astrocytic junctions could also depend on interactions with the actin-binding ZO-1 protein. Therefore, co-immunoprecipitation experiments were performed (Fig. 3A). Immunoprecipitation using MLC1 antibody-coupled beads was highly efficient and specific, as almost no MLC1 was detected in the non-bound fraction and no MLC1 was detected in the immunoprecipitate with an unrelated IgG (Fig. 3A). In the MLC1 immunoprecipitate, a specific protein band around 220 kDa detected by a ZO-1 antibody was also copurified (Fig. 3A). Similar results were found using other MLC1 antibodies (data not shown).

In contrast, analogous co-immunoprecipitation experiments to detect other proteins located at astrocyte junctions (occludin,  $\beta$ -catenin, N-cadherin and vinculin) or those forming part of the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC) (Haenggi and Fritschy, 2006), which have been shown to be related with MLC1 (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007; Lanciotti et al., 2009), resulted in no co-immunoprecipitation (Supplementary Fig. 2A). Furthermore, we studied whether the CIC-2 chloride channel could be co-immunoprecipitated with MLC1, because its KO mouse displayed a myelin vacuolation similar to what has been detected in MLC patients (Blanz et al., 2007), but no co-immunoprecipitation was detected (Supplementary Fig. 2A).

To extend these results from rat astrocyte cultures to human tissues, double EM immunostainings were performed in human brain tissue. We used high-resolution EM to clearly distinguish between astrocyte–endothelial and astrocyte–astrocyte contacts around blood

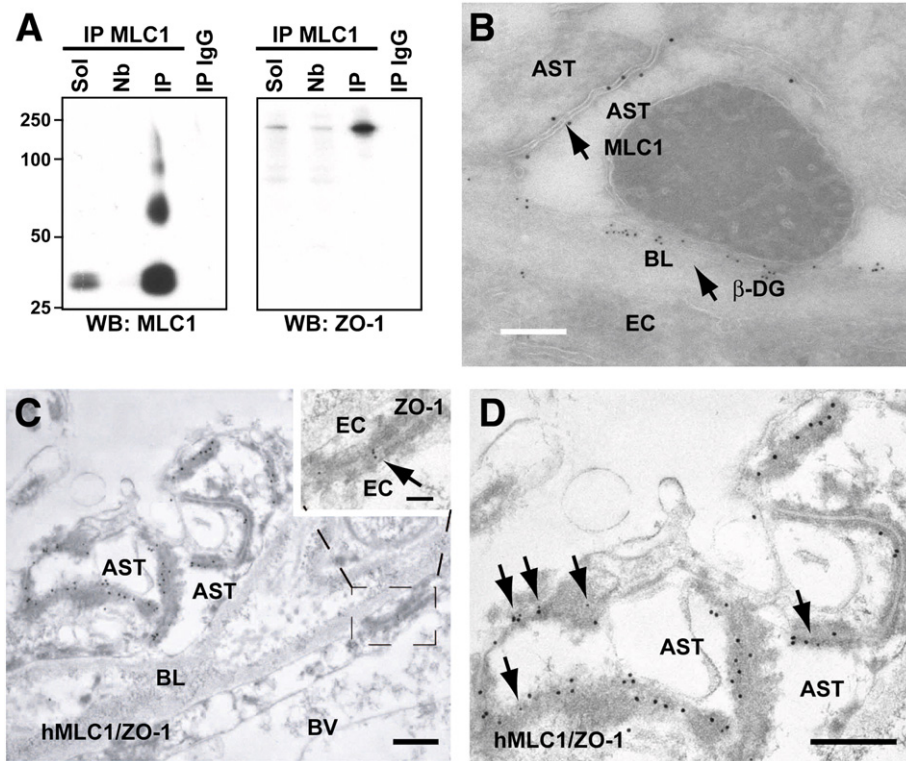
vessels. First, antibodies against MLC1 and  $\beta$ -Dystroglycan were used (Fig. 3B). The DGC protein  $\beta$ -Dystroglycan was used as a marker of astrocyte–endothelial junctions. As already described (Haenggi and Fritschy, 2006), small gold particles corresponding to  $\beta$ -Dystroglycan were detected in astrocyte membranes contacting basal laminae. In contrast, larger gold particles, corresponding to MLC1 protein, were located only at the dense junctions of point contact (puncta adherens) seen between astrocytes. In agreement with MLC1 not being co-localized with the DGC at points of interaction between astrocytes and endothelial cells, no change in MLC1 localization was found in several DGC-null brains including Dystrophin KO ( $\text{mdx}^{\beta\text{-geo}}$ ),  $\alpha$ -Dystrobrevin KO and Utrophin KO mice (Supplementary Fig. 2B–E).

Similar to rat astrocyte cultures, ZO-1 (Fig. 3C and D) colocalizes with MLC1 in astrocyte–astrocyte junctions in the human tissue. Although ZO-1 is typically expressed in endothelial cells, many groups have detected additional expression in astrocytes (Li et al., 2004; Penes et al., 2005). The specificity of the antibody used against ZO-1 was evident, since it also detected ZO-1 in endothelial cell junctions (see inset of Fig. 3C for ZO-1) (Fanning and Anderson, 2009).

#### *Experimental approach to create an astrocyte cell model with reduced MLC1 expression*

As the subcellular localization of MLC1 in quiescent primary rat astrocyte culture was found comparable to what was detected in brain





**Fig. 3.** Co-immunoprecipitation and colocalization of ZO-1 and MLC1 in astrocyte junctions. (A) Rat brain membranes were solubilized (Sol), and then immunoprecipitated using anti-MLC1 coupled beads. No MLC1 was detected in the not-bound (Nb) fraction or in the immunoprecipitate with an unrelated IgG (IP IgG). MLC1 immunoprecipitate showed a specific ~225 kDa protein band detected by the antibody directed against ZO-1. (B) EM double immunostaining with anti-human MLC1 and  $\beta$ -Dystroglycan antibodies showed that the latter is expressed in astrocyte membranes in contact with the basal lamina, whereas MLC1 is located at the cell contacts between astrocytes. Scale bar: 500 nm (C and D) Examples of double immunolabelling showing co-localization of MLC1 (18 nm gold particles) and ZO-1 (12 nm gold particles, arrows) in astrocyte–astrocyte junctions in human tissue. Anti-human MLC1 antibody showed post-embedding staining in astrocyte–astrocyte junctions and co-localized with ZO-1 (arrows in D) in human cerebellum. Note that ZO-1, but not human MLC1, is also expressed in junctions between endothelial cells (C, boxed area at higher magnification at the top right, arrows). D shows a higher magnification image observed in C. Arrows point to sites of ZO-1 expression. Scale bars in C, D: 500 nm; boxed area in C: 100 nm. BL, basal lamina; BV, Blood vessel; EC, endothelial cell; AST, astrocyte; and  $\beta$ -DG,  $\beta$ -Dystroglycan.

tissue, it was concluded that such astrocytes could be used as a cellular model to address the functions of MLC1. Recent work showed that mutations found in MLC patients cause complete lack of MLC1 protein (Duarri et al., 2008). Therefore, our next aim was to study the consequences of a reduction in the expression of MLC1 in this cell model.

We produced two adenoviral vectors each expressing a distinct shRNA (756 and 905) against rat MLC1 together with the fluorescent protein EmGFP, allowing visualization of transduced cells. A vector expressing shRNA without homology to any mammalian cDNA (SCR) was used as a control. To validate that the levels of MLC1 mRNA were reduced, we performed RT-PCR experiments 3 days after the infection with the adenovirus (performed at the multiplicity of infection (MOI) of two viruses per cell) (Fig. 4A). MLC1 mRNA levels were nearly depleted in astrocytes infected with vectors expressing shRNA directed against MLC1, but were unaffected by the control shRNA (SCR).

Time course Western blot experiments performed after transduction at the same MOI showed that 5 days after the infection, almost no MLC1 protein was detected in astrocytes infected with the MLC1 shRNA (Fig. 4B). Similar results were obtained by immunofluorescence (Fig. 4C), additionally confirming that the signal detected in astrocyte junctions in previous experiments was related to MLC1 and not to other proteins detected by our antibodies.

As an additional control, astrocytes were depleted of endogenous MLC1 by the action of shRNA, and afterwards, they were complemented with the adenovector expressing HA-tagged human MLC1 (HAhMLC1), which was resistant to this shRNA (Fig. 4C).

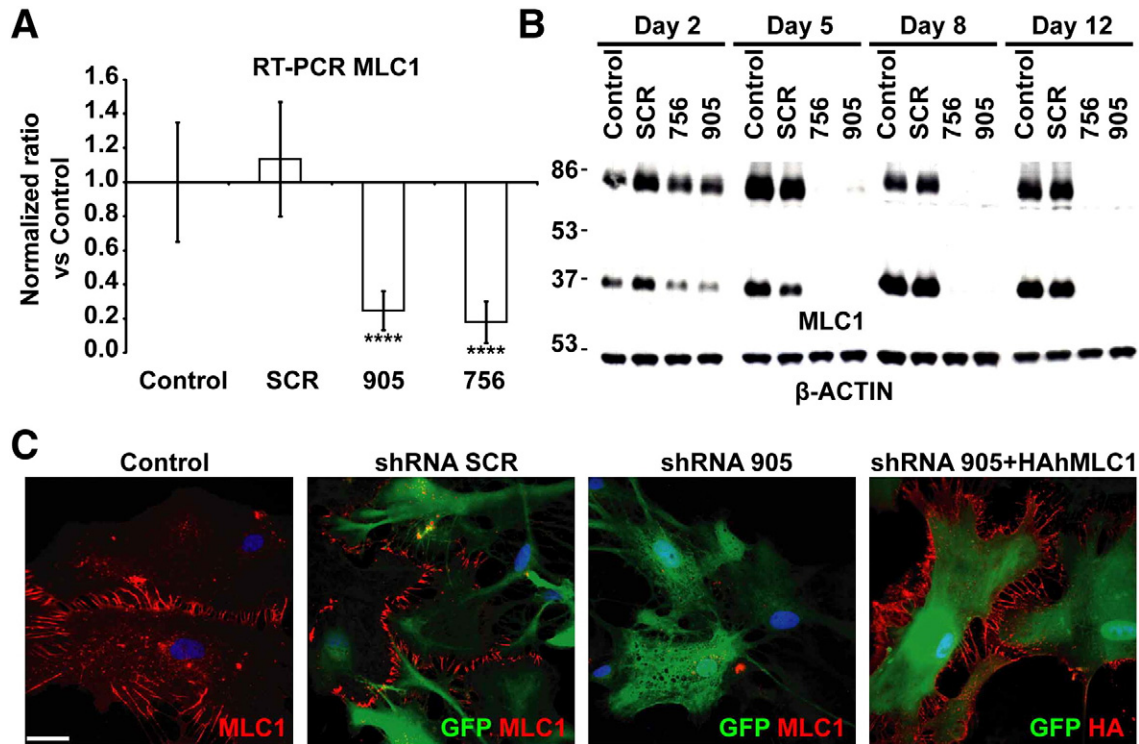
Next, we aimed to further deplete or totally eliminate MLC1 expression in the primary cultures. Cells infected at MOIs higher than 20 began to show signs of mortality irrespective of the adenovector,

including the control type (not shown). Following further titration experiments we selected a MOI of 5 as the highest dose of vector not showing any toxic effects.

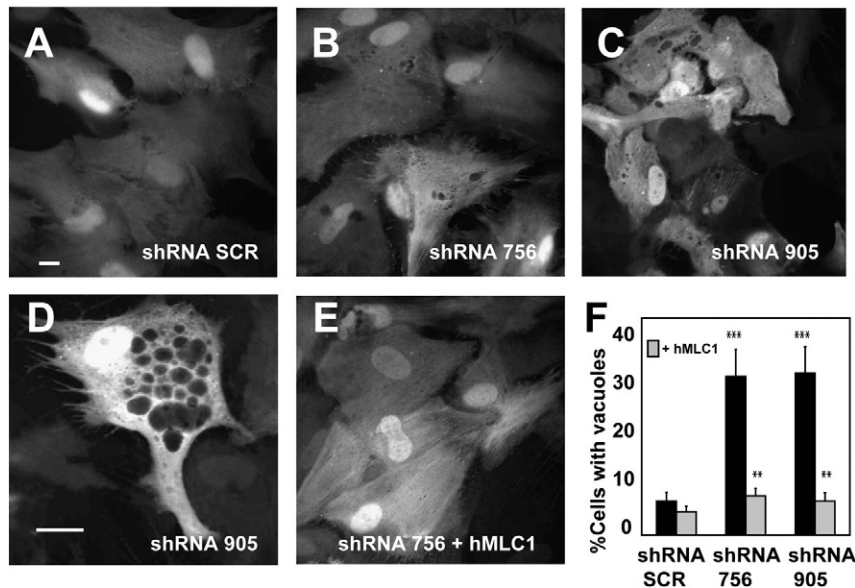
#### *Reduction of MLC1 expression caused vacuolation of astrocytes in primary cultures and in human MLC brain*

Cells depleted of MLC1 displayed intracellular vacuoles scattered through the cytosol. This effect was observed for each of the shRNAs against MLC1 (Fig. 5B and C or D for shRNA 756 and 905, respectively), but rarely occurred in non-transduced astrocytes, or astrocytes expressing the control shRNA (Fig. 5A). We quantified the number of cells showing vacuolation (defined as number of cells with at least three vacuoles of a size bigger than  $0.5\ \mu\text{m}$ ) in seven to eight independent experiments (8 exp, N = 758 cells for shRNA SCR; 7 exp, N = 591 cells for shRNA 756; 8 exp, N = 1063 cells for shRNA 905). Vacuolation occurred in  $31.9 \pm 5.4\%$  of the infected cells with shRNA 756,  $32.6 \pm 5.3\%$  in cells with shRNA 905 and  $6.8 \pm 1.8\%$  in the cells expressing the shRNA SCR.

To ensure that the defects observed in shRNAs directed against MLC1 transduced astrocytes were due to the lack of MLC1 and not to side effects of the shRNAs expression, co-expression experiments with human MLC1 (hMLC1) were performed (4 to 5 independent experiments; N = 654 cells for shRNA SCR + hMLC1, N = 604 cells for shRNA 756 + hMLC1, and N = 762 cells for shRNA 905 + hMLC1). As shown in Fig. 5E, cells depleted of endogenous MLC1 and complemented with human MLC1 displayed a significantly lower percentage of vacuolation ( $7.9 \pm 1.5\%$  versus  $31.9 \pm 5.4\%$  for shRNA 756 + hMLC1;  $6.8 \pm 1.7\%$  versus  $32.6 \pm 5.3\%$  for shRNA 905 + hMLC1).



**Fig. 4.** Adenovector-mediated knockdown of MLC1 in rat primary astrocytes. (A) RT-qPCR experiment using specific primers to detect MLC1 mRNA. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different astrocyte preparations either control or treated with indicated shRNAs. Both shRNA 756 and 905 caused almost complete inhibition of mRNA expression. \*\*\*\*,  $P < 0.0005$  (B) Astrocytes (untreated or transduced at MOI 2 with shRNA SCR, shRNA 756 and shRNA 905) were analyzed after 2, 5, 8 or 12 days by Western blot using antibodies against MLC1, which was detected mainly as a monomer and as a dimer.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. Note that increasing the time after the transduction resulted in further reduction of MLC1 expression. Representative results of up to 10 different experiments are shown. (C) Control or astrocytes transduced at MOI 2, 7 days after the treatment, were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies against MLC1. Transduced cells were visualized by the positive GFP signal. Note that MLC1 signal is detected in control cells and cells infected with the SCR shRNA but not in cells infected with the shRNA 905. Right-hand panel: cells were co-transduced with shRNA 905 at MOI 2 and HA-tagged human MLC1 (resistant to shRNA) at MOI 1. Immunofluorescence, obtained using antibodies against the HA epitope. Scale bar: 20  $\mu$ m.



**Fig. 5.** Morphological alterations caused by changes in MLC1 expression. Primary culture of astrocytes were transduced with adenovectors expressing shRNA SCR (A), shRNA 756 (B) or shRNA 905 (C) at MOI 5. After 7 days cells were fixed, stained with DAPI and visualized in a CellR Imaging System. Pictures were taken using a 40 $\times$  objective. Scale bar: 20  $\mu$ m. (D) Typical example of an astrocyte transduced with shRNA 905 at a higher (63 $\times$  objective) magnification. Vacuoles of different sizes were observed through the cytosol. Scale bar: 10  $\mu$ m (E) Representative micrograph of an astrocyte transduced with adenovectors expressing shRNA 756 and human MLC1 (F) Quantification of the number of cells showing vacuolation. hMLC1: Cells transduced with the shRNA and complemented with MOI 2 of the human HA-tagged MLC1-adenovector. The data correspond to 4 to 8 independent experiments with the number of cells analyzed for each shRNA as follows: shRNA SCR (n = 758), shRNA 756 (n = 591), shRNA 905 (n = 1063), shRNA SCR + hMLC1 (n = 654), shRNA 756 + hMLC1 (n = 604), and shRNA 905 + hMLC1 (n = 762). The degree of vacuolation was quantified manually using images prepared in Adobe Photoshop. Significance was compared in the groups 756 and 905 vs SCR (black stars), and between the groups 756 and 905 versus 756 + MLC1 and 905 + MLC1, respectively (gray stars). \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.005$ .

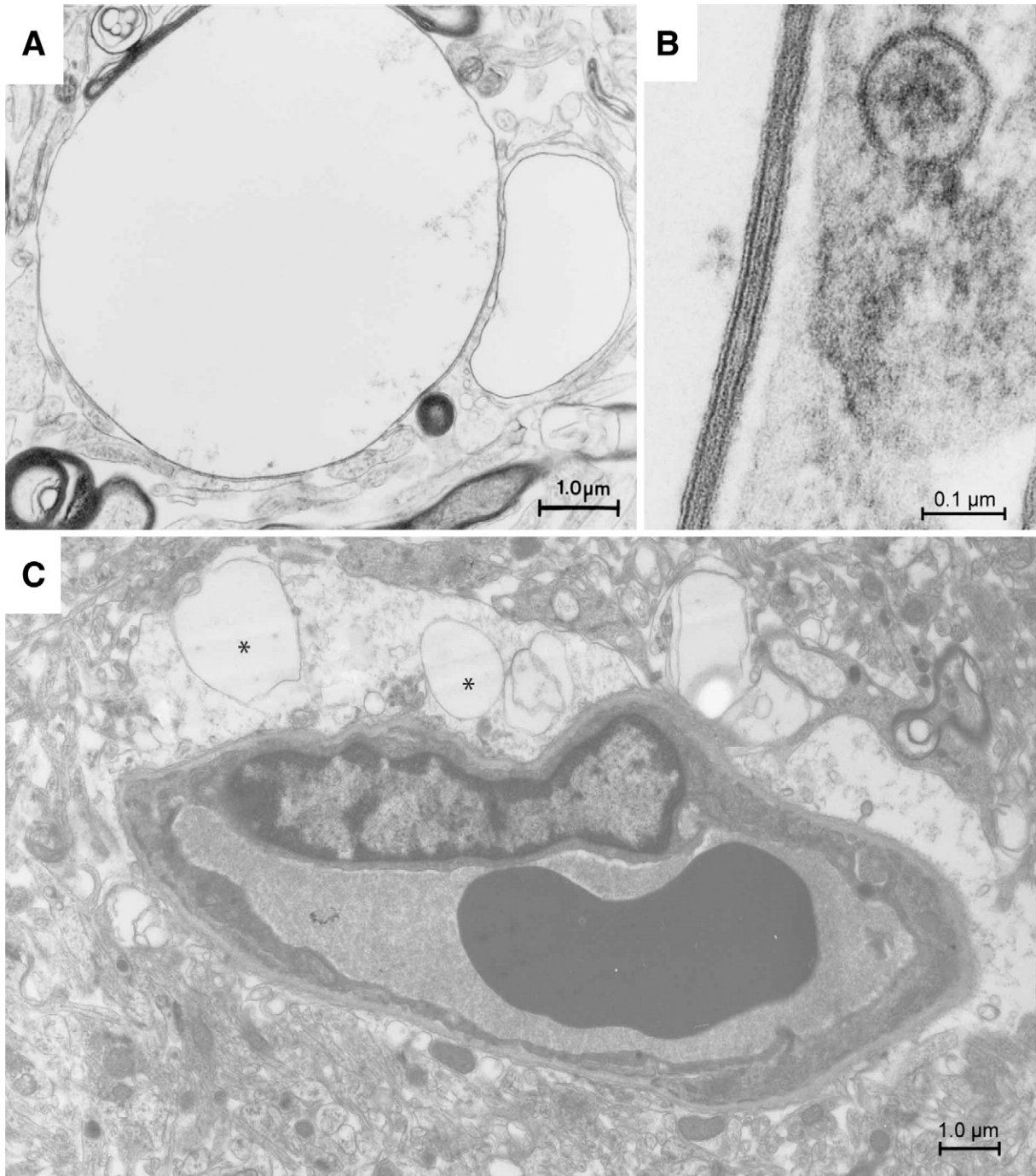


Because of these results, we re-examined by electron microscopy the brain biopsy of an MLC patient (van der Knaap et al., 1996). These studies revealed again countless fluid-filled vacuoles in myelin sheaths (Fig. 6A and B), as described previously (van der Knaap et al., 1996). Additionally, vacuoles were consistently found within all perivascular astrocytic endfeet within the sections examined (Fig. 6C). Mitochondria were well preserved, indicating that the vacuole formation was not due to inadequate fixation.

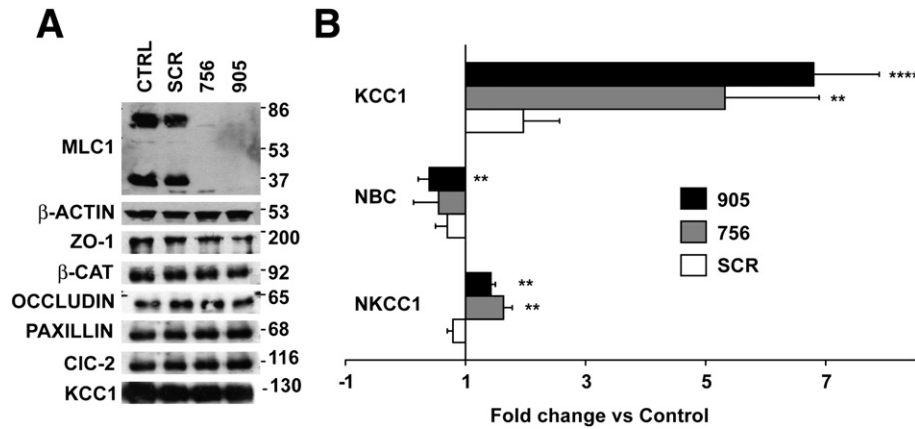
The correlation between the vacuolation observed in MLC1-depleted astrocytes and the astrocytic vacuoles in MLC brain tissue suggested that this cellular model could be useful to study the pathogenesis of MLC.

#### *Loss of MLC1 results in mRNA expression changes of transporters involved in cell volume regulation*

Our first objective was to detect whether loss of MLC1 affected the levels of specific proteins associated with cell–cell junctions. Moreover, we analyzed levels of ClC-2 protein, which have also been detected in astrocyte–astrocyte junctions (Sik et al., 2000). At least three independent experiments for ZO-1,  $\beta$ -Catenin, Occludin, Paxillin or ClC-2 revealed no changes in expression of the respective proteins after MLC1 depletion (Fig. 7A). Similarly, no changes in protein localization were found for  $\beta$ -Catenin, Cx43, ZO-1 and Occludin (Supplementary Fig. 3).



**Fig. 6.** Electron microscopy images of brain tissue from an MLC patient. (A) A membrane-covered vacuole is attached to a myelin sheath. (B) High magnification shows that the membrane displays the typical periodicity of myelin with the presence of major dense lines and intraperiod lines. (C) Astrocytic endfeet projecting toward a vessel also contain vacuoles (asterisks). Scale bars are shown in the lower right corner.



**Fig. 7.** Changes in expression of transporters and channels related with volume regulation. (A) 7 days after shRNA adenovector-mediated expression, cell extracts were analyzed in Western blots using antibodies against specific proteins. The result shown is representative of at least three independent experiments. Quantification using ImageJ of these different experiments revealed that levels of the different proteins studied were not statistically different in cells treated with the shRNA against MLC1 vs. controls or cells transduced with SCR shRNA (data not shown). (B) RT-qPCR experiments using specific primers to detect KCC1, NBC and NKCC1 mRNAs. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different astrocyte preparations treated as indicated. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0005$ .

Unfortunately, the available antibodies against CIC-2 detected a diffuse signal in control astrocytes only, thus were not suitable for determining the localization of CIC-2 in these cells.

The homology of MLC1 to ion channels is suggestive of a function related with ion homeostasis, which would influence cell volume. Vacuolation of astrocytes with reduced MLC1 expression could also be indicative of a defect in water and/or cell volume regulation. Therefore, we measured the mRNA levels for several genes involved in cell-volume regulation in astrocytes after depletion of MLC1 (Fig. 7B). These genes included the potassium-chloride cotransporter KCC1 (Ernest et al., 2005), the sodium-bicarbonate cotransporter NBC (Nagelhus et al., 2004) and the sodium-potassium chloride cotransporter NKCC1 (Su et al., 2002), and performed real-time PCR experiments after MLC1 depletion. In four independent experiments we observed a substantial increase in expression for KCC1 ( $5.32 \pm 1.57$  fold for shRNA 756;  $6.8 \pm 1.1$  fold for shRNA 905), a moderate increase for NKCC1 ( $1.63 \pm 0.15$  fold for shRNA 756;  $1.42 \pm 0.07$  fold for shRNA 905) and a moderate decrease for NBC ( $0.55 \pm 0.40$  fold for shRNA 756;  $0.39 \pm 0.15$  fold for shRNA 905). Notably, transduction with SCR shRNA also induced KCC1 expression when compared with control astrocytes ( $1.96 \pm 0.6$ ), but the level of induction was much higher in astrocytes infected with shRNA against MLC1. However, when analyzing at the same time point after adenoviral transduction, the levels of KCC1 protein expression by Western blot no statistical differences were observed (Fig. 7A).

## Discussion

The present study extends our knowledge on the important factors for MLC1 localization in astrocytes and provides a cell model to study the pathophysiology of MLC disease.

Results obtained from rat and mouse astrocytes and from mouse and human tissue localize MLC1 in astrocyte-astrocyte contacts. Colocalization experiments between MLC1 and other junction proteins indicate that these contain components typically described in tight (Occludin, ZO-1), adherent ( $\beta$ -Catenin) and gap junctions (Cx43). Co-immunoprecipitation and colocalization experiments suggest that anchoring of MLC1 at these junctions involves an interaction with the adaptor molecule ZO-1. The protein ZO-1 is a member of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) homologue family of proteins (Fanning and Anderson, 2009), which works as a regulated scaffold for tight junction proteins due to its ability to bind to the cortical actin cytoskeleton.

Tight junctions in astrocytes have also been described by other authors (Mack and Wolburg, 2006; Wolburg et al., 1983, 2009). A

previous study (Duffy et al., 2000) reported that after treatment with Interleukin-1-beta ( $IL-1\beta$ ), human fetal astrocytes expressed the typical tight junction molecule Claudin 1 and formed another type of junction that the authors called tight junction-like structures. An open question is whether these junctions are able to form a barrier to the flux of molecules, as several studies indicate that astrocytes do not contribute *per se* to blood-brain barrier properties in mammals (Wachtel et al., 2001). However, as astrocytic perivascular endfeet cover the vessel wall completely (Mathiisen et al., 2010), astrocytes must be involved in the exchange of water and solutes between blood and brain, although the understanding of the mechanisms employed is incomplete.

Our results indicate that MLC1 is linked to the actin cytoskeleton, as its localization was altered with cyt-D, but not when disrupting the microtubule network. MLC and Alexander disease are both leukodystrophies in which astrocytes are affected and which share some phenotypic features (Gorospe and Maletkovic, 2006). We investigated whether MLC1 localization is altered after transfection of a dominant mutant of GFAP or in Alexander disease models. This work indicates that MLC1 localization is not dramatically altered in these models, suggesting that the localization of MLC1 is not related with the integrity of the intermediate filament network. In line with this data, Vinculin, which does not colocalize with MLC1, was altered in astrocytes from GFAP mutant mice (Cho and Messing, 2009), suggesting that the integrity of the GFAP network is important for correctly located focal adhesions, but not for the stability of junctions between astrocytes.

There are differences between these and previous results from us and other groups in the localization of MLC1 (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007; Lanciotti et al., 2009). Some data suggesting that MLC1 formed part of the DGC were based on colocalization analyses using confocal microscopy (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007, 2005; Teijido et al., 2004). In view of the small distances between different membranes at and between the endfeet, a high resolution technique such as electron immunogold immunocytochemistry is advisable (Teijido et al., 2007). Taking the new data into account, we favor the idea that MLC1 is not located in areas of astrocytic processes contacting endothelial cells, but rather in areas of astrocytic processes that link astrocytes with each other. Interestingly, the DGC itself is also involved in the organization and maintenance of junctional complexes during development (Nico et al., 2003, 2004; Sjo et al., 2005). Considering the data from other authors (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007), the exact relationship between the DGC and the localization of MLC1 still needs to be clarified. An interesting unifying hypothesis that could explain these differences is that MLC1 expressed



in different compartments might associate with different protein complexes having distinct physiological roles.

Although MLC1 was coimmunoprecipitated with the ZO-1 protein, a protein detected in astrocyte cell junctions, reduction of MLC1 protein levels did not cause any alteration in protein levels or in its subcellular localization in this protein or in the other junctional proteins studied. We interpret this data as MLC1 not being necessary for the formation and maintenance of these junctions.

In agreement with the suggested role of MLC1 in ion/water homeostasis, reduction of MLC1 protein levels causes vacuolation in astrocytes. In the initial characterization of the brain biopsy of an MLC patient (van der Knaap et al., 1996), the number of large intramyelinic vacuoles was overwhelming. At re-examination of the EM tissue, we specifically focused on astrocytic processes, where MLC1 is located. This study revealed that all astrocytic processes in the sections examined consistently contain vacuoles. We conclude then that astrocytic endfeet vacuolation is also a hallmark of MLC disease. Whether the vacuoles detected in myelin are due to non-cell autonomous effects or due to the lack of MLC1 in neurons still needs to be clarified.

Similar to the vacuolation detected in MLC patients, the knockout mouse of the CIC-2 chloride channel displayed myelin vacuolation (Blanz et al., 2007). Because the knockout mice also displayed alterations in other tissues than brain, such as blindness and infertility (Bosl et al., 2001), we reasoned that *CLCN2* was unlikely to be another MLC disease gene. In agreement with this reasoning, no mutations were found in MLC patients without mutations in the *MLC1* gene and without linkage to the *MLC1* locus (Scheper et al., 2010). Our data cannot exclude that the CIC-2 protein may be involved in the pathogenesis of the disease, but indicate that there is not a direct association between MLC1 and the CIC-2 proteins.

The initial set of experiments, aimed to understand the vacuolation that occurs after MLC1 depletion, showed that these astrocytes had increased levels of mRNA for KCC1 and NKCC1. In contrast and by unknown mechanisms, the protein level of KCC1 was unchanged. These proteins have been described to play a role in Regulatory Volume Decrease (RVD) and Regulatory Volume Increase (RVI) processes in glioma cells, respectively (Ernest et al., 2005; Pasantes-Morales et al., 2006; Su et al., 2002). We speculate that the changes in the expression are a consequence of the vacuolation and do not drive this process, as vacuolation was not observed in KO mice and in patients with mutation in these genes (Delpire et al., 1999; Igarashi et al., 1999; Rust et al., 2007). The precise mechanism of how the lack of MLC1 causes the vacuolation of astrocytes still needs to be clarified.

In conclusion, this work provides the first cellular model of MLC disease, that mimics the phenotypic features found in an MLC patient. The astrocyte culture described here constitutes a good starting cell model to study the molecular basis of the processes that are involved in the pathogenesis of MLC.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.nbd.2011.03.015.

### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

### Role of funding source

This study was supported in part by SAF 2009–07014 (RE), PS09/02672-ERARE to RE, Fundación Ramon Areces project (RE), ELA Foundation 2007–017 C4 project (RE and MSvdK), 2009 SGR 719 to RE, SAF 2009–12606-C02-02 (VN), CIBERER INTRA08/750 (RE and VN), 2009 SGR01490 to VN. RE is a recipient of an ICREA Academia prize. MCR, IB, GSC and MSvdK are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (TOP grant 9120.6002), the Hersenstichting (grants 10 F02(2).02, 13 F05.04 and 15 F07.30) and the Optimix Foundation for Scientific Research. D.C.G. and C-F.L.

gratefully acknowledge the EU Interreg support: Advanced Microscopy Network (AdMiN) project. AM is supported by NIH grants NS-060120, NS-42803 and HD-03352.

### Acknowledgments

We thank Miguel Morales, Xavier Gasull and Soledad Alcántara for initial help with primary astrocyte cultures, Logopharm GmbH for initial proteomic studies, Elena Ambrosini for the gift of antibodies against DGC proteins, Thomas J Jentsch for the gift of antibodies against CIC-2 and KCC1, Nienke Postma for performing the immunohistochemical stainings in brain tissue from a patient with Alexander disease, Gajja S. Salomons for performing mutational analysis of the GFAP gene in the patient with Alexander disease and Isidre Ferrer for providing us with human brain samples.

### References

- 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. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 480–493.
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hubner, C.A., Jentsch, T.J., 2007. Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel CIC-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., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C., van der Knaap, M.S., 2005. MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 412–419.
- Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J.C., van Horsen, J., Dinopoulos, A., Bove, K.E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F., et al., 2007. MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.* 114, 403–410.
- Bosl, M.R., Stein, V., Hubner, C., Zdebek, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A.F., Jentsch, T.J., 2001. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(−) channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289–1299.
- Cho, W., Messing, A., 2009. Properties of astrocytes cultured from GFAP over-expressing and GFAP mutant mice. *Exp. Cell Res.* 315, 1260–1272.
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., Thorne, T., 1999. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat. Genet.* 22, 192–195.
- Derouiche, A., Frotscher, M., 2001. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330–341.
- Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A., et al., 2008. Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3728–3739.
- Duffy, H.S., John, G.R., Lee, S.C., Brosnan, C.F., Spray, D.C., 2000. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 20, RC114.
- 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. Cell Physiol.* 288, C1451–C1460.
- 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.
- Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M., Rapisarda, C., 1997. Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia* 21, 217–227.
- Gorospe, J.R., Maletkovic, J., 2006. Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 113–122.
- Haenggli, T., Fritschy, J.M., 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1614–1631.
- Hagemann, T.L., Connor, J.X., Messing, A., 2006. Alexander disease-associated glial fibrillary acidic protein mutations in mice induce Rosenthal fiber formation and a white matter stress response. *J. Neurosci.* 26, 11162–11173.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., Rubin, L.L., 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 14), 1603–1613.
- Igarashi, T., Inatomi, J., Sekine, T., Cha, S.H., Kanai, Y., Kunimi, M., Tsukamoto, K., Satoh, H., Shimadzu, M., Tozawa, F., et al., 1999. Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nat. Genet.* 23, 264–266.
- Ijla Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C., Pronk, J.C., 2006. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 505–512.

- Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., Navon, R., 2004. Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 125B, 31–37.
- Kalman, M., Szabo, A., 2001. Immunohistochemical investigation of actin-anchoring proteins vinculin, talin and paxillin in rat brain following lesion: a moderate reaction, confined to the astroglia of brain tracts. *Exp. Brain Res.* 139, 426–434.
- Lancioti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M., et al., 2010. MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: Role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.* 37 (3), 581–595.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., et al., 2001. Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 831–838.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C., van der Knaap, M.S., 2002. Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.* 110, 279–283.
- Li, X., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., Lu, S., Kamasawa, N., Morita, M., Davidson, K.G., Yasumura, T., Rash, J.E., Nagy, J.L., 2004. Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience* 126, 611–630.
- Lien, C.F., Hazai, D., Yeung, D., Tan, J., Fuchtbauer, E.M., Jancsik, V., Gorecki, D.C., 2007. Expression of alpha-dystrobrevin in blood-tissue barriers: sub-cellular localisation and molecular characterisation in normal and dystrophic mice. *Cell Tissue Res.* 327, 67–82.
- Mack, A.F., Wolburg, H., 2006. Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Res.* 1103, 25–31.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103.
- McCarthy, K.D., de Vellis, J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890–902.
- Mignot, C., Delarasse, C., Escaich, S., Della Gaspera, B., Noe, E., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Pekny, M., Vicart, P., Boespflug-Tanguy, O., et al., 2007. Dynamics of mutated GFAP aggregates revealed by real-time imaging of an astrocyte model of Alexander disease. *Exp. Cell Res.* 313, 2766–2779.
- Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O., et al., 2006. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 292.
- Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., Ottersen, O.P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905–913.
- Nicchia, G.P., Rossi, A., Mola, M.G., Procino, G., Frigeri, A., Svelto, M., 2008. Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes. *Glia* 56, 1755–1766.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondammatteo, F., Herken, R., Girolamo, F., Marzullo, A., Svelto, M., Roncali, L., 2003. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42, 235–251.
- Nico, B., Paola Nicchia, G., Frigeri, A., Corsi, P., Mangieri, D., Ribatti, D., Svelto, M., Roncali, L., 2004. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience* 125, 921–935.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R.A., Ramos-Mandujano, G., Tuz, K.L., 2006. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am. J. Med.* 119, S4–S11.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A., et al., 2003. Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534–537.
- Penes, M.C., Li, X., Nagy, J.L., 2005. Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 22, 404–418.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M.G., Francolini, M., Vicentini, L.M., Pietrini, G., 2002. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell Sci.* 115, 3331–3340.
- Rouach, N., Glowinski, J., Giaume, C., 2000. Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell Biol.* 149, 1513–1526.
- Rust, M.B., Alper, S.L., Rudhard, Y., Shmukler, B.E., Vicente, R., Brugnara, C., Trudel, M., Jentsch, T.J., Hubner, C.A., 2007. Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J. Clin. Invest.* 117, 1708–1717.
- Scheper, G.C., van Berkel, C.G., Leisle, L., de Groot, K.E., Errami, A., Jentsch, T.J., Van der Knaap, M.S., 2010. Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 14, 255–257.
- Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R., Lesch, K.P., 2003. The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* 44, 283–295.
- 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.
- Sjo, A., Magnusson, K.E., Peterson, K.H., 2005. Association of alpha-dystrobrevin with reorganizing tight junctions. *J. Membr. Biol.* 203, 21–30.
- Sorci, G., Agneletti, A.L., Bianchi, R., Donato, R., 1998. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1448, 277–289.
- Su, G., Kintner, D.B., Sun, D., 2002. Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1136–C1146.
- Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M., Estevez, R., 2004. Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2581–2594.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A., Estevez, R., 2007. Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.* 26, 532–545.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Ozguc, M., Seboun, E., 2000. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 733–739.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., Valk, J., 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.
- Wachtel, M., Bolliger, M.F., Ishihara, H., Frei, K., Bluethmann, H., Gloor, S.M., 2001. Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurochem.* 78, 155–162.
- Wolburg, H., Kastner, R., Kurz-Isler, G., 1983. Lack of orthogonal particle assemblies and presence of tight junctions in astrocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). A freeze-fracture study. *Cell Tissue Res.* 234, 389–402.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75–96.



**Artículo publicado en Abril de 2011 en la  
revista THE AMERICAN JOURNAL OF  
HUMAN GENETICS**



# Mutant GlialCAM Causes Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts, Benign Familial Macrocephaly, and Macrocephaly with Retardation and Autism

Tania López-Hernández,<sup>1,9</sup> Margreet C. Ridder,<sup>3,9</sup> Marisol Montolio,<sup>1,4</sup> Xavier Capdevila-Nortes,<sup>1</sup> Emiel Polder,<sup>3</sup> Sònia Sirisi,<sup>1,6</sup> Anna Duarri,<sup>1,4</sup> Uwe Schulte,<sup>7</sup> Bernd Fakler,<sup>7</sup> Virginia Nunes,<sup>2,5,6</sup> Gert C. Scheper,<sup>3</sup> Albert Martínez,<sup>8</sup> Raúl Estévez,<sup>1,4,10,\*</sup> and Marjo S. van der Knaap<sup>3,10,\*</sup>

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a leukodystrophy characterized by early-onset macrocephaly and delayed-onset neurological deterioration. Recessive *MLC1* mutations are observed in 75% of patients with MLC. Genetic-linkage studies failed to identify another gene. We recently showed that some patients without *MLC1* mutations display the classical phenotype; others improve or become normal but retain macrocephaly. To find another MLC-related gene, we used quantitative proteomic analysis of affinity-purified MLC1 as an alternative approach and found that GlialCAM, an IgG-like cell adhesion molecule that is also called HepaCAM and is encoded by *HEPACAM*, is a direct MLC1-binding partner. Analysis of 40 MLC patients without *MLC1* mutations revealed multiple different *HEPACAM* mutations. Ten patients with the classical, deteriorating phenotype had two mutations, and 18 patients with the improving phenotype had one mutation. Most parents with a single mutation had macrocephaly, indicating dominant inheritance. In some families with dominant *HEPACAM* mutations, the clinical picture and magnetic resonance imaging normalized, indicating that *HEPACAM* mutations can cause benign familial macrocephaly. In other families with dominant *HEPACAM* mutations, patients had macrocephaly and mental retardation with or without autism. Further experiments demonstrated that GlialCAM and MLC1 both localize in axons and colocalize in junctions between astrocytes. GlialCAM is additionally located in myelin. Mutant GlialCAM disrupts the localization of MLC1-GlialCAM complexes in astrocytic junctions in a manner reflecting the mode of inheritance. In conclusion, GlialCAM is required for proper localization of MLC1. *HEPACAM* is the second gene found to be mutated in MLC. Dominant *HEPACAM* mutations can cause either macrocephaly and mental retardation with or without autism or benign familial macrocephaly.

## Introduction

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC, MIM 604004) is a leukodystrophy with autosomal-recessive inheritance.<sup>1</sup> Patients develop macrocephaly during the first year of life. After several years, there is evidence of slow neurological deterioration, including cerebellar ataxia, spasticity, epilepsy, and mild cognitive decline. From early on, magnetic resonance imaging (MRI) reveals diffuse signal abnormality and swelling of the brain white matter and subcortical cysts (Figure S1, available online).<sup>1</sup> In follow-up exams, the white matter abnormalities remain and atrophy ensues.<sup>1</sup> A brain biopsy from an MLC patient showed extensive myelin vacuolation, mainly affecting the outer myelin layers, which causes the swollen appearance of the white matter.<sup>2</sup> In 2001, we demonstrated that mutations in *MLC1* (MIM 605908) cause MLC.<sup>3</sup> *MLC1* mutations are found in approximately 75% of the MLC patients.<sup>4</sup> MLC1 is an oligomeric membrane protein that is expressed almost exclusively in the brain. It has some degree of homology to ion channels.<sup>5,6</sup> Within the brain, MLC1 is mainly located

in astrocyte-astrocyte junctions close to blood- and cerebrospinal fluid (CSF)-brain barriers, Bergmann glia, and main axonal tracts.<sup>5–7</sup> Thus far, the physiological role of MLC1 has remained unknown, and a suggested role in ion transport has not been confirmed.<sup>3,5,8</sup>

In some families, members with MLC do not have *MLC1* mutations, and these families do not show linkage to the *MLC1* locus, indicating that mutations in at least one other gene are involved in MLC,<sup>9,10</sup> but genetic-linkage studies failed to identify another disease gene. We recently described two distinct phenotypes among MLC patients without *MLC1* mutations.<sup>11</sup> The classical phenotype retains typical clinical and MRI features, as seen in patients with *MLC1* mutations.<sup>1,11</sup> The second, improving phenotype is initially the same as the classical phenotype but lacks clinical deterioration and shows major improvement or normalization of the MRI abnormalities (Figure S1).<sup>11</sup>

Because of the unsuccessful genetic-linkage studies and the possibility of further genetic heterogeneity, we decided to use alternative strategies to identify eligible candidate genes.

<sup>1</sup>Sección de Fisiología, <sup>2</sup>Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Child Neurology, VU University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands; <sup>4</sup>Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-750, <sup>5</sup>Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-730, ISCIII, 08907 Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, 08907 Barcelona, Spain; <sup>7</sup>Logopharm GmbH, Engesserstrasse 4, 79108 Freiburg, Germany; <sup>8</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Institute for Research in Biomedicine, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>10</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [restevez@ub.edu](mailto:restevez@ub.edu) (R.E.), [ms.vanderknaap@vumc.nl](mailto:ms.vanderknaap@vumc.nl) (M.S.v.d.K.)

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.02.009. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.



## Material and Methods

The studies on human samples were performed with approval of the institutional review board, VU University Medical Center, Amsterdam, and informed consent from the families. The animal experimental protocols were approved by the Animal Care and Ethics Committee of the University of Barcelona. Protocols for the use and manipulation of the animals were approved by the Government of Catalonia.

### Biochemistry

#### Preparation of Source Material

Plasma membrane-enriched protein fractions were prepared from pools of freshly isolated whole rat or mouse brains according to the procedure used in Zolles et al.<sup>12</sup> For solubilization, the prepared membrane vesicles were resuspended in ComplexioLyte buffer 47a (at 0.8 mg protein/ml, LOGOPHARM GmbH, Germany; with protease inhibitors added) and incubated for 30 min at 4°C; nonsoluble components were removed afterward by ultracentrifugation (10 min at 150,000 × g). Efficiency of solubilization was determined by immunoblot analysis of SDS-PAGE-resolved aliquots of solubilize and pellet fractions. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were probed with rabbit polyclonal antibodies ( $\alpha$ -N1 or  $\alpha$ -NH, 1:10,000, see below), stained with goat anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnologies, USA) and developed with ECL+ (GE Healthcare, USA).

#### Preparation of Antibodies

Immune sera against N-terminal mouse MLC1 peptides ( $\alpha$ -N1 and  $\alpha$ -N2) and the  $\alpha$ -NH (anti-N-terminus of human MLC1) antibody were generated and characterized previously.<sup>5,7,13</sup> The  $\alpha$ -NH also recognizes mouse/rat MLC1. Immune sera against a mouse GlialCAM synthetic peptide (QRIREQDESGQVEISA), corresponding to amino acids 403–418 of GlialCAM, were raised in rabbits with the help of the services provided by Eurogentec. The peptide was coupled to keyhole limpet hemocyanin via a cysteine residue that has been added to the N-terminal end of the peptide. After three boosts of immunization, the antisera were affinity purified with the peptide covalently coupled to Sulpholink (Pierce). The polyclonal antibody was tested by immunoblotting, immunofluorescence, and immunoprecipitation on HeLa cells expressing human GlialCAM and on mouse brain tissue.

#### Affinity Purification

For each experiment, 1.5 ml freshly prepared solubilize (rat or mouse) was incubated for 2 hr at 4°C with 20  $\mu$ g of the respective immobilized antibody<sup>13</sup> ( $\alpha$ -N1,  $\alpha$ -N2  $\alpha$ -NH,  $\alpha$ -GlialCAM, IgG = control rabbit IgG [Upstate, USA]). After a brief washing (twice for 5 min each time) with ComplexioLyte 47a, bound proteins were eluted with Laemmli buffer (dithiothreitol [DTT] was added after elution). Eluates were then briefly run on SDS-PAGE gels followed by silver staining and tryptic digestion. During these experiments, samples were taken for immunoblot analysis with the indicated MLC1 and GlialCAM antibodies.

#### Preparation of Myelin

Myelin was prepared as described previously.<sup>14</sup> Two brains from 6- to 8-week-old wild-type mice were homogenized in 20 volumes of homogenization buffer (0.32 M sucrose in 10 mM HEPES [pH 7.4]) with five strokes with a loose pestle and seven strokes with a tight pestle. The homogenate was layered over 0.85 M sucrose, centrifuged at 25,000 rpm for 30 min in a swinging bucket rotor. Proteins located in the interphase were removed, resuspended in 10 volumes of water, and centrifuged at 25,000 rpm for 15 min.

The pellet was twice cleansed of sucrose by water suspension and centrifugation. Then, pellets were suspended again in homogenization buffer and layered over 0.85 M sucrose and centrifuged at 25,000 rpm for 30 min. The interphase layer was again suspended in water, centrifuged for 15 min, and resuspended in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) containing 1% Triton X-100. Protein was quantified by bicinchoninic acid, and 20  $\mu$ g was used for SDS-PAGE and immunoblot analyses.

### Mass Spectrometric Analysis

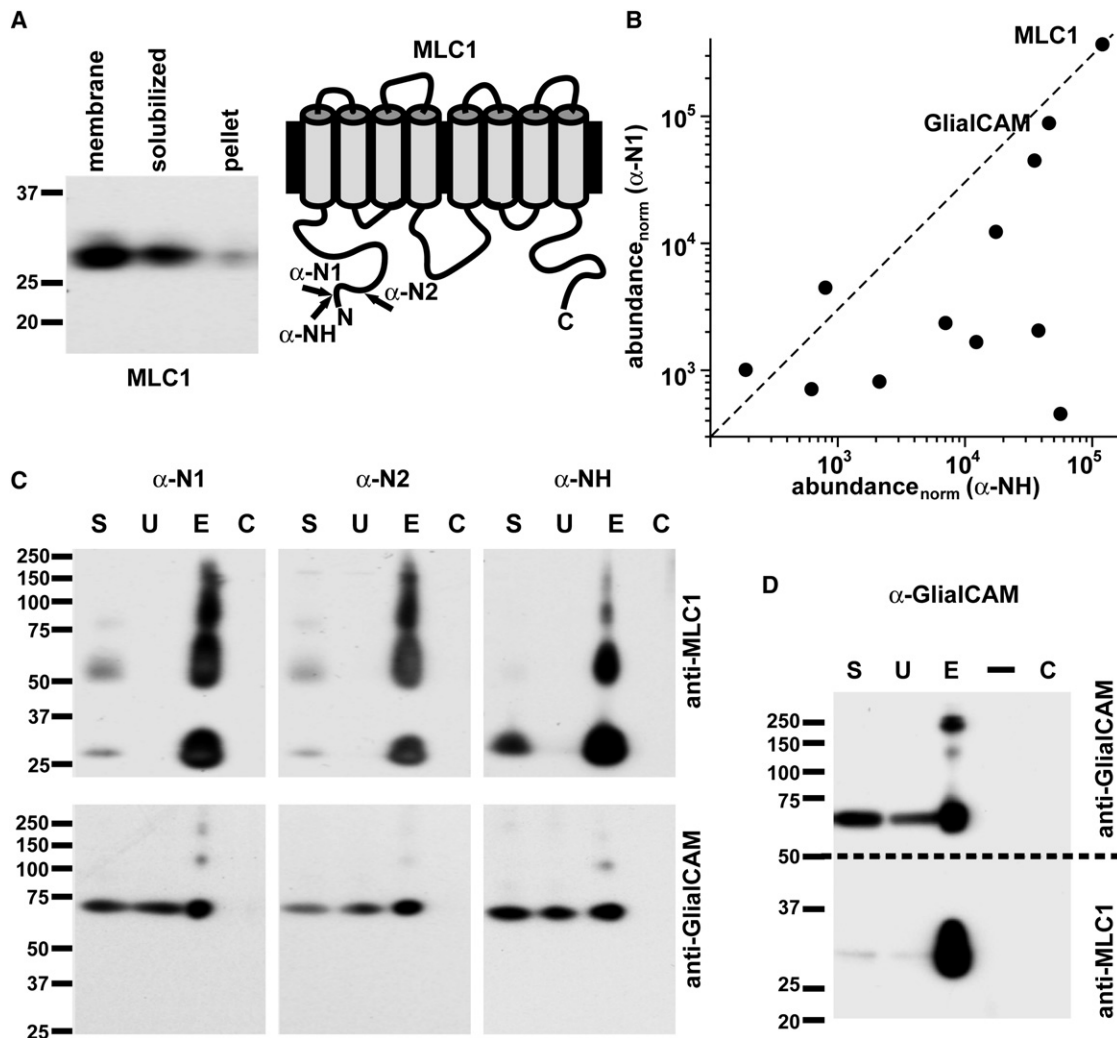
*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Analysis* Stained gel lanes were excised in two parts (upper and lower), and proteins were digested with trypsin according to the procedure described previously.<sup>15</sup> Extracted peptides dissolved in 0.5% trifluoroacetic acid were loaded on a precolumn (C18 PepMap100, 5  $\mu$ m; Dionex, Idstein, Germany) of an UltiMate 3000 HPLC (Dionex, Idstein, Germany). An aqueous organic gradient was then applied for elution and separation of peptides on a 75  $\mu$ m column packed with C18 beads (ReproSil-Pur 120 ODS-3; Dr. A Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany) and directly electrosprayed into an LTQ-FT mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany; ion source: Proxeon, Odense, Denmark). Each scan cycle consisted of one FTMS full scan and up to five ITMS dependent MS/MS scans of the five most intense ions. Dynamic exclusion (30 s, mass width 20 ppm) and monoisotopic precursor selection were enabled. Using Mascot (Matrix Science, UK) we searched extracted MS/MS spectra against the Swiss-Prot database (*Mammalia*). We allowed common variable modifications and one missed tryptic cleavage; peptide tolerance was  $\pm$  10 ppm and MS/MS tolerance was  $\pm$  0.8 Da. Proteins that (1) were identified by only one specific MS/MS spectrum or (2) presented exogenous contaminations like keratins, trypsin, or immunoglobulins were not considered in further evaluations.

#### Protein Quantification

We used two previously detailed protein quantification methods<sup>16</sup> that are both based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) peptide signal intensities extracted (as peak volumes [PVs]; m/z tolerance was 6 ppm) and aligned (between individual LC-MS runs by their retention times; tolerance was 8%) with MS Inspect (Computational Proteomics Laboratory, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA) and in-house written software. The relative quantity of a protein in affinity purification sample versus control was calculated as a median of consistent peak volume ratios of respective peptides (rPV). Ensuring the significance of rPVs, required that at least two peptide ratios had assigned PVs totaling 100,000 volume units. Proteins were regarded as specifically (co-) purified when their rPV values were higher than 10. The molar amounts of different proteins were compared by using abundance<sub>norm</sub> values (as in Figure 1), calculated as the sum of all assigned peak volumes (totalPV) divided by the number of MS-accessible amino acids (sequence of tryptic peptides with masses between 740 and 3000 Da under the MS settings used).

### Genetic Analysis

The diagnosis of MLC was established by MRI criteria.<sup>1</sup> In those MLC patients in whom we found no mutations in *MLC1* by sequence analysis of genomic DNA, as well as analysis of *MLC1* cDNA and MLPA, we analyzed *HEPACAM* (hepatic and glial cell adhesion molecule, MIM 611642), the gene encoding GlialCAM. *HEPACAM* primers were designed with ExonPrimer (Table S1). Accession numbers of the reference sequences are NM\_152722.4



**Figure 1. Proteomic Identification of GlialCAM as a Major Binding Partner of MLC1**

(A) Affinity purification (AP) strategy based on efficient MLC1 solubilization (left) as visualized by immunoblot analysis of SDS-PAGE-resolved samples from rat brain membrane, solubilisate, and pellet (stained with anti-MLC1 ( $\alpha$ -N1)) and three antibodies (right) directed against N-terminal epitopes of MLC1. Similar results were obtained when two different antibodies were applied or when the three antibodies were applied simultaneously, confirming the specificity of the proteomics data.

(B and C) Evaluation of MLC1 affinity purifications with the indicated antibodies. (B) 2D plot of protein abundances determined by mass spectrometry (for  $\text{abundance}_{\text{norm}}$  values see [Material and Methods](#)) of AP with  $\alpha$ -N1 (from rat brain) versus AP with  $\alpha$ -NH (from mouse brain). Only proteins specifically enriched (more than 10-fold of the amount in the respective IgG control) and identified in both APs are shown (as dots). Note the distinct quantitative correlation of GlialCAM with MLC1. Pearson correlation of GlialCAM and MLC1  $\text{abundance}_{\text{norm}}$  values across all three APs and controls is  $r = 0.96$ . (C) Immunoblot analysis of APs with the indicated antibodies stained with anti-MLC1 ( $\alpha$ -N1; upper) and anti-GlialCAM (lower); lanes resolve aliquots of solubilisate before (S) and after AP (U), of eluates from APs (E), and of corresponding IgG control APs (C).

(D) Immunoblots showing specific copurification of MLC1 in an AP with anti-GlialCAM (samples and antibodies labeled as before). “–” indicates no sample was loaded.

(mRNA) and NT\_033899.8 (gDNA). PCR amplification of exons 1–6 of *HEPACAM* and their surrounding intronic regions was carried out with Platinum TAQ DNA Polymerase according to the manufacturer’s instructions (Invitrogen). For exon 7, which has a very high-GC content, Platinum TAQ DNA-polymerase (Invitrogen) was used in combination with 5X AccuPrime™ GC-Rich Buffer A (Invitrogen). The PCR products were analyzed by cycle sequencing on an ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with the same primers used for PCR amplification, with the exception of the forward primer of exon 1. The resulting chromatograms were analyzed with Sequence Pilot (JSI Medical Systems GmbH) with ENSG00000165478 as reference sequence.

#### *Immunofluorescent and Electron Microscopic Studies in Tissue*

Tissue immunohistochemistry was performed as previously described.<sup>5,7</sup> For electron microscopic (EM) studies, small human cerebellum samples were obtained postmortem, fixed in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer, and processed. They were cryoprotected gradually in sucrose and cryofixed by immersion in liquid propane. Freeze substitution was performed at  $-90^{\circ}\text{C}$  during 3 days in an Automatic Freeze Substitution System (AFS, Leica); methanol containing 0.5% uranyl acetate was used as a substitution medium. Infiltration was carried out in Lowicryl HM20 at  $-50^{\circ}\text{C}$  and then polymerized with UV lamps. Ultrathin sections were collected and processed for



postembedding immunostaining. For double immunostaining, grids were incubated with rabbit anti-N4-human MLC1 (1:10) and mouse anti-GlialCAM (1:10) antisera. The binding of primary antibodies was visualized by incubating with goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies conjugated to either 12 or 18 nm gold particles (British BioCell, International). In control experiments, the primary antibodies were omitted—no immunogold labeling occurred under these conditions.

### Primary Culture and Adenoviral Transduction

Rat primary astrocytes were prepared as described previously<sup>13</sup> with some modifications. Cortex and hippocampus were removed from newborn (1 to 3 days old) Sprague Dawley rats (Charles River). Cerebral cortices were dissected and the meninges were carefully removed in cold sterile 0.3% BSA and 0.6% glucose in PBS. The tissue was trypsinized for 10 min at 37°C and mechanically dissociated in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; with 10% heat-inactivated fetal bovine serum [Biological Industries], 1% penicillin/streptomycin [Invitrogen] and 1% glutamine [Invitrogen] plus 40 U/ml DNase I [Sigma]) through a small bore fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was pelleted and resuspended in fresh complete DMEM, filtered through a 100- $\mu$ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm<sup>2</sup> cell-culture flasks (TPP). When the mixed glial cells reached confluence, contaminating microglia, oligodendrocytes, and precursor cells were dislodged by mechanical agitation and removed as previously described.<sup>17</sup>

Astrocytes were plated in 6-well plates at a density of  $4 \times 10^5$  cells per well or in poly-D-lysine-coated coverslips at  $7.5 \times 10^4$  cells per 24-well plate. Medium was changed every 3 days. To increase the expression of MLC1 and GlialCAM detection at the plasma membrane (data not shown), we arrested astrocytic cultures in the cell cycle by addition of 2  $\mu$ M cytosine  $\beta$ -D-arabino-furanoside (AraC, Sigma). Cultured astrocytes were identified by their positive GFAP staining (Dako).

Construction of adenovirus expressing wild-type HA-tagged human MLC1 has been described.<sup>13</sup> In a similar manner, we constructed and produced adenoviruses expressing three copies of the flag epitope fused to wild-type human GlialCAM or to human GlialCAM containing either the recessive mutations p.Arg92Gln, p.Arg98Cys, and p.Ser196Tyr or the dominant mutations p.Arg92Trp and p.Gly89Asp.

To infect astrocytes, we added adenoviruses at multiplicity of infection (MOI) 3 and kept them overnight at 37°C. Cells were washed, and then fresh medium was added. Astrocytes were incubated at 37°C until they were processed.

## Results

### MLC1-Interacting Proteins

We used a method of quantitative proteomic analysis of affinity-purified MLC1 to identify candidate genes for MLC. Independent affinity-purification experiments with MLC1 were performed with solubilized brain membranes and three different antibodies directed against peptides from the MLC1 N terminus (Figure 1A). Protein abundance determined by quantitative mass spectrometry identified HepaCAM, more correctly called GlialCAM,<sup>18</sup> as the protein with the second highest yield (after MLC1) in all purifications (Figure 1B and Figure S2A). Immunoblots

with antibodies against GlialCAM (Figure S3) demonstrated that the protein was present in all purifications with all different MLC1 antibodies (Figure 1C). Not all GlialCAM coimmunoprecipitated with MLC1 (Figure 1C), possibly because not all GlialCAM is associated with MLC1 or because the coassembly dissolves during membrane protein solubilization. We confirmed the interaction between GlialCAM and MLC1 in reverse affinity purification experiments by using an antibody against GlialCAM that specifically coimmunoprecipitated GlialCAM and MLC1 from brain membranes. In the reverse purification, nearly all MLC1 was associated with GlialCAM (Figure 1D). Coimmunoprecipitation experiments with extracts from cells transfected with both genes also showed positive interaction (Figure S2B), indicating a direct interaction between the proteins. These findings made *HEPACAM* an excellent candidate gene for MLC patients without *MLC1* mutations.

### *HEPACAM* Mutations in MLC Patients without *MLC1* Mutations

We analyzed the exons and surrounding intronic regions of *HEPACAM* in 40 patients from 34 families from around the world. In ten patients from eight families, we found two *HEPACAM* mutations (Table 1). Sequence analysis of *HEPACAM* in the parents showed autosomal-recessive inheritance of the two mutations in all cases except for one family with a de novo mutation. None of the patients had two mutations that abrogate expression of GlialCAM. In 18 patients from 16 families, we found one *HEPACAM* mutation, which was either inherited from a parent or arose de novo (Table 1). In 12 patients from ten families, we did not find *HEPACAM* mutations.

The observed nucleotide changes in *HEPACAM* are most likely pathogenic. They were not observed in 400 control chromosomes. All missense mutations affect amino acids that are conserved across a wide range of species (Figure 2B). Nine missense mutations affect amino acids in the predicted immunoglobulin domains in the extracellular part of GlialCAM (Figures 2A and 2C). p.Pro148Ser affects a residue between the two immunoglobulin domains. All these amino acid substitutions are predicted to affect protein function (SIFT). The substitution of residue Leu23 by His is predicted to affect the signal peptide, which spans the first 33 amino acids (SignalP 3.0 Server). Patient EL775 had two missense mutations, both inherited from the father. p.Asp128Asn is probably the pathogenic mutation because it is also observed in patients EL158 and EL708.

In 12 patients from ten families, neither *MLC1* nor *HEPACAM* mutations were found. In these families, we could not exclude linkage with both the *MLC1* and *HEPACAM* loci with certainty (data not shown). The possibility of hidden *MLC1* or *HEPACAM* mutations cannot, therefore, be excluded, and it is not certain that there must be a third gene mutated in MLC.

**Table 1. HEPACAM Mutations**

Patient	Exon	DNA	Protein	P/M/de novo <sup>a</sup>
<b>Two Mutations</b>				
EL84/85	3	c.587C>A	p.Ser196Tyr	P <sup>b</sup>
	4	c.789G>A	p.Trp263X	M
EL106	3	c.580 delC, 582C>T (hom)	p.Leu194PhefsX60	P + M
EL125	3	c.442C>T (hom)	p.Pro148Ser	<b>P</b> + M
EL726	2	c.275G>A	p.Arg92Gln	P
	3	p.631G>A	p.Asp211Asn	M
EL774	2	c.292C>T (hom)	p.Arg98Cys	- <sup>c</sup>
EL785	1	c.68T>A	p.Leu23His	de novo
		c.461_462 del	p.Ser154TyrfsX16	<b>P</b> <sup>d</sup>
	4	c.742G>T	p.Gly248X	<b>P</b> <sup>d</sup>
EL816	3	c.442C>T (hom)	p.Pro148Ser	P+M
EL889/890	2	c.292C>T (hom)	p.Arg98Cys	P+M
<b>One Mutation</b>				
EL128	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	de novo
EL158	2	c.382G>A	p.Asp128Asn	<b>P</b> <sup>e</sup>
EL604	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	<b>P</b>
EL611	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	<b>M</b>
EL624/625	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	<b>M</b>
EL683/684	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	<b>P</b>
EL686	2	c.266G>A	p.Gly89Asp	<b>P</b>
EL700	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	-
EL708	2	c.382G>A	p.Asp128Asn	-
EL743	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	M
EL775	2	c.382G>A	p.Asp128Asn	P <sup>d</sup>
	5	c.862C>T	p.Arg288Cys	P <sup>d</sup>
EL847	2	c.404_406 del	p.Lys135 del	<b>P</b>
EL862	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	<b>M</b>
EL882	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	de novo
EL903	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	<b>M</b> <sup>e</sup>
EL944	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	de novo

<sup>a</sup> P, paternal; M, maternal; bold and italic indicates macrocephaly.

<sup>b</sup> Probably from father but no DNA available.

<sup>c</sup> No DNA of the parents available.

<sup>d</sup> Both changes from same parental allele.

<sup>e</sup> Transient macrocephaly.

### Inheritance, Phenotypes, and Mutations

All ten patients with two *HEPACAM* mutations inherited in an autosomal-recessive fashion had the classical phenotype (Table S2). They had infantile-onset macrocephaly and delayed-onset motor deterioration, epilepsy, and

cognitive decline of variable severity. The MRI showed typical white matter abnormalities in all stages of the disease (Figure S1). The parents were normal, but two of the 16 had macrocephaly (Table 1).

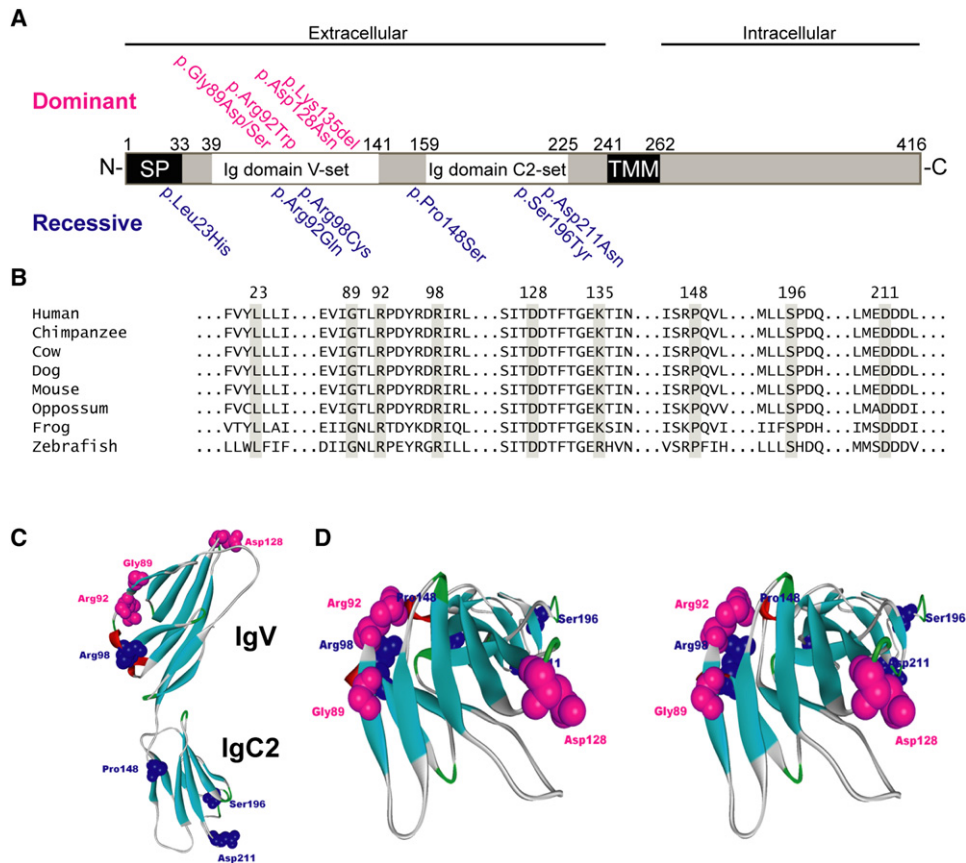
All 18 patients with one *HEPACAM* mutation had the improving phenotype (Table S3). They developed macrocephaly within the first year. In two of the 18, the head circumference subsequently normalized. The motor capabilities became normal or almost normal. Some patients had normal intelligence, and others, with intelligence quotients (IQs) between 50 and 75, had a stable mental retardation. Three of the mentally retarded patients also had autism or pervasive developmental disorder not otherwise specified according to DSM IV criteria. In summary, 11 of the 18 patients became clinically normal, apart from macrocephaly. MRI initially showed typical abnormalities but, on follow up, major improvement or normalization (Figure S1). For 13 patients from 11 families, eight of the 11 parents with the mutated allele had macrocephaly, one had transient macrocephaly as a child, and two never had macrocephaly as far as they could remember. Regarding the five remaining patients, the *HEPACAM* mutation arose de novo in three, and their parents had normal head circumference; DNA of the parents was not available in two. Only one of the parents without the mutated allele had macrocephaly. The family data suggest autosomal-dominant inheritance for the single *HEPACAM* mutations with variable penetrance. An analysis of microsatellite markers near *HEPACAM* in the families with the two most common dominant mutations (p.Gly89Ser and p.Arg92Trp) revealed no shared haplotype, excluding the possibility of founder effects for these two mutations (data not shown).

The *HEPACAM* mutations were either recessive or dominant. The recessive mutations were spread over the extracellular region of GlialCAM, whereas the dominant mutations were clustered in one of the predicted immunoglobulin-like domains (Figure 2C). Molecular modeling of the extracellular domain of GlialCAM showed that dominant mutations are located in a putative interface of the first immunoglobulin domain (Figure 2D).

### GlialCAM-MLC1 Interaction

Immunohistochemistry of human brain tissue demonstrated GlialCAM expression mainly around blood vessels (Figure 3 and Figure S3). Double immunostaining with a monoclonal antibody against GlialCAM and a polyclonal antibody against human MLC1<sup>13</sup> showed that MLC1 and GlialCAM colocalize at astrocytic end-feet (Figure 3A). Immunogold EM confirmed this colocalization in astrocyte-astrocyte junctions (Figure 3B).

GlialCAM mRNA and protein have been detected in oligodendrocytes, astrocytes,<sup>18</sup> and neurons<sup>19</sup> (Figure S3), whereas MLC1 has not been detected in oligodendrocytes.<sup>5-7,20</sup> In MLC, vacuolation mainly affects the outer layers of myelin sheaths.<sup>2</sup> We investigated whether GlialCAM is localized in myelin. EM immunogold revealed



**Figure 2. Genetic Studies in MLC Patients**

(A) Schematic representation of domains in GlialCAM and position of missense mutations. The positions of several domains in human GlialCAM were predicted with PFAM, SOSUI, and SignalP 3.0. The following abbreviations are used: SP, signal peptide; TMM, transmembrane domain; Ig, Immunoglobulin. The missense mutations found in MLC patients are indicated above (dominant, in pink) and below (recessive, in blue) the figure.

(B) Conservation of affected amino acids. GlialCAM protein sequences were aligned with ClustalW software. The amino acids affected by missense mutations are indicated by a gray bar. The position of the affected residues in the human sequence is given above the sequences. NCBI accession numbers: *Homo sapiens*, NP\_689935.2; *Pan troglodytes*, XP\_522240.2; *Bos taurus*, NP\_001026929.1; *Canis familiaris*, XP\_852267.1; *Mus musculus*, NP\_780398.2; *Monodelphis domestica*, XP\_001371494.1; *Danio rerio*, NP\_001018526.1. Ensembl protein ID: *Xenopus tropicalis*, ENSXETP00000008539.

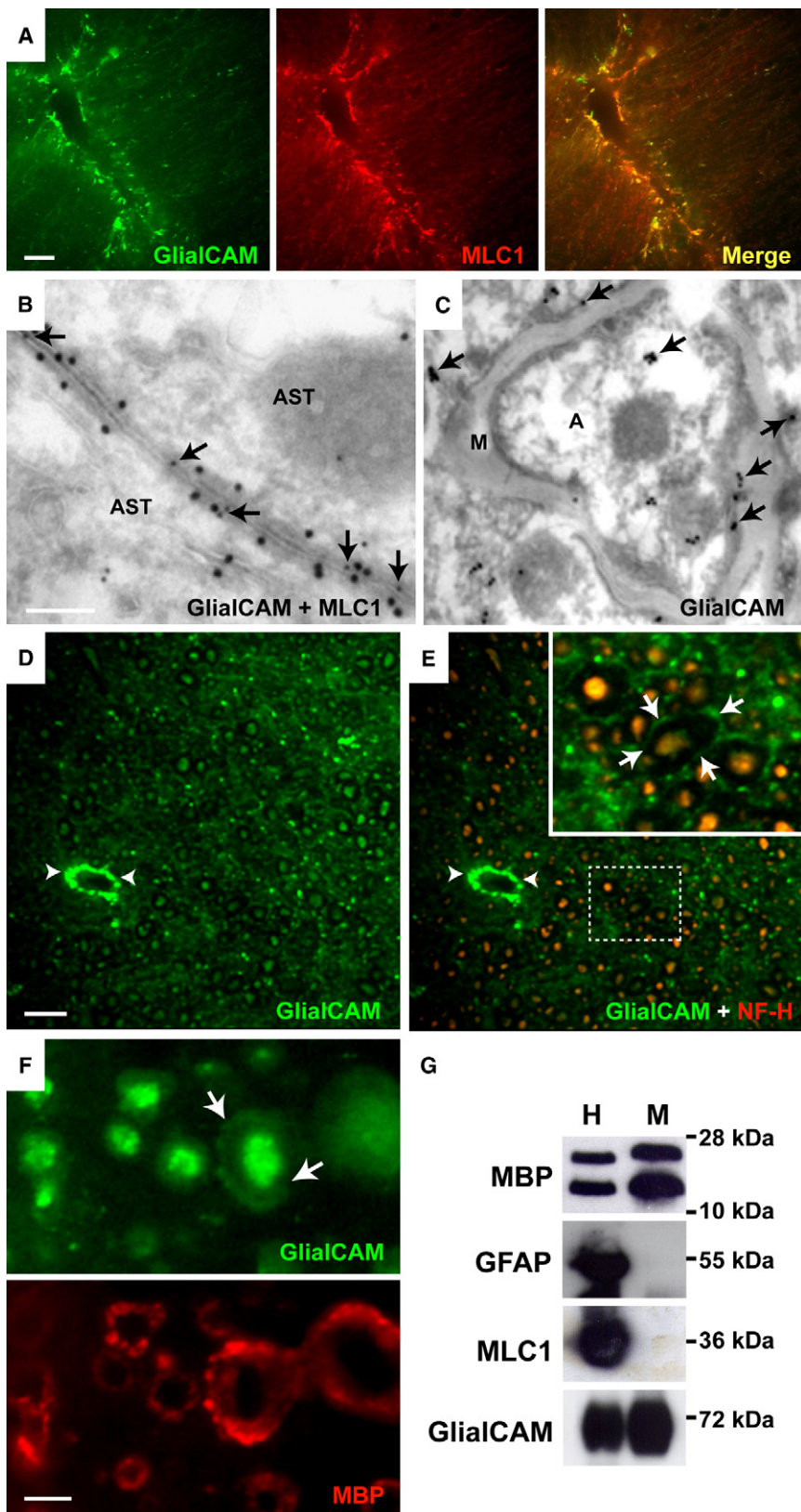
(C) Schematic model of the protein GlialCAM. The structural model of the extracellular domain was accomplished with the automated homology-modeling server of the Expasy server. Mutated residues are depicted with the same color-code as in (A).

(D) Stereo view of a ribbon representation viewed from the top of a structural model of the extracellular domain of GlialCAM. Pink highlights the residues mutated in dominant MLC, and blue highlights the residues in recessive MLC. Dominantly mutated residues are located in the putative extracellular-binding pocket, suggesting that it might mediate protein-ligand interactions.

particles inside axons, in contact regions between myelin and axons, and surrounding myelin (arrows in Figure 3C). In human medulla oblongata sections, where axons and myelin can be observed easily, immunostainings combining antibodies against GlialCAM with antibodies against neurofilament heavy chain (NF-H) or myelin basic protein (MBP) demonstrated that GlialCAM and NF-H staining coincide in axons (Figures 3D and 3E) and that not only is GlialCAM observed on the outside of myelin sheaths (inset in Figure 3E), but there is also a weak colocalization with MBP in myelin (Figure 3F). Classical biochemical fractionation protocols to purify myelin<sup>14</sup> and immunoblotting to detect specific proteins revealed GlialCAM but not MLC1 in the myelin fraction (Figure 3G).

The effect of mutations located in the extracellular domain of GlialCAM was studied in cultures of primary astrocytes, the cell type with the highest natural abundance of both MLC1 and GlialCAM. After adenoviral-mediated expression, lysates of astrocytes were analyzed by immunoblot and immunofluorescence. Expression levels of all types of mutant GlialCAM were not statistically different from wild-type GlialCAM (Figure S4). Immunofluorescence revealed that MLC1 and GlialCAM are located in cell-cell junctions between astrocytes (Figure 4A). Coexpression of wild-type MLC1 and GlialCAM containing the recessive mutations p.Arg92Gln or p.Arg98Cys resulted in diffuse intracellular MLC1 and GlialCAM localization with partial enrichment in cell membranes but not specifically in cell junctions (Figure 4B and Figure S5A). No defect





**Figure 3. Colocalization of MLC1 and GlialCAM in Brain Tissue**

(A) Double-immunolabeling experiments in human cerebellum, combining GlialCAM (in green) with MLC1 (in red), shows nearly complete colocalization (Merge, in yellow) in astrocytic processes surrounding a blood vessel.

(B) Double-immunolabeling EM shows colocalization of MLC1 (18 nm gold particles) and GlialCAM (with a commercially available monoclonal antibody; 12 nm gold particles, arrows) in astrocyte-astrocyte junctions in human tissue.

(C) Postembedding staining of GlialCAM in human cerebellum also shows immunoreactivity (arrows) inside axons, in contact regions between myelin and axons, and in cells that surround myelin.

(D–F) Localization of GlialCAM in human medulla oblongata. Using the polyclonal rabbit antibody, we detected GlialCAM in astrocytes surrounding blood vessels (arrowheads in D and E), in axons, and in myelin (arrows in inset in E and in F). Double immunolabeling of GlialCAM and NF-H, which stains axons, confirmed colocalization of GlialCAM and NF-H (yellow staining in E). The dashed line in E indicates the area amplified in the inset. Double immunolabeling of GlialCAM and MBP, which stains myelin, demonstrated a weak labeling of GlialCAM in myelin.

(G) Myelin was purified from brains of 6- to 8-month-old mice as described in the [Material and Methods](#). Twenty microgram of the initial homogenate (H) and of myelin (M) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Blots were probed with antibodies against MBP, GFAP, MLC1, and GlialCAM. The amount of GFAP detected in the myelin fraction was low as compared to the homogenate, indicating that the contamination of the myelin fraction with nonmyelin proteins was low. The following abbreviations are used: AST, astrocyte; MBP, myelin basic protein; GFAP, glial fibrillary acid protein; NF-H, neurofilament heavy chain; M, myelin; A, axon.

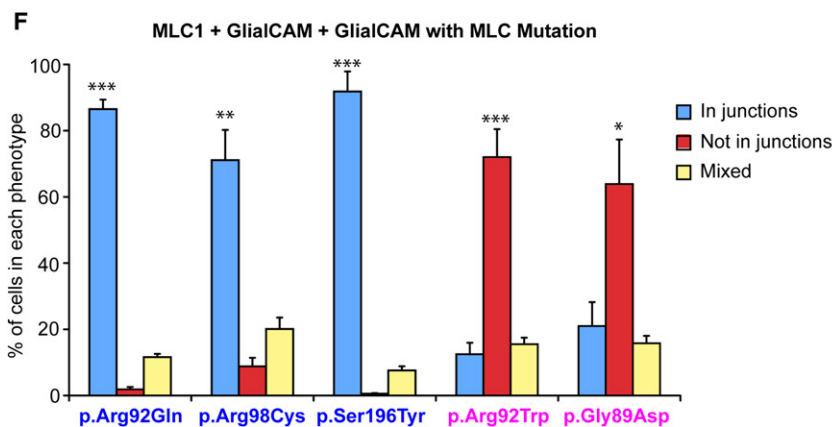
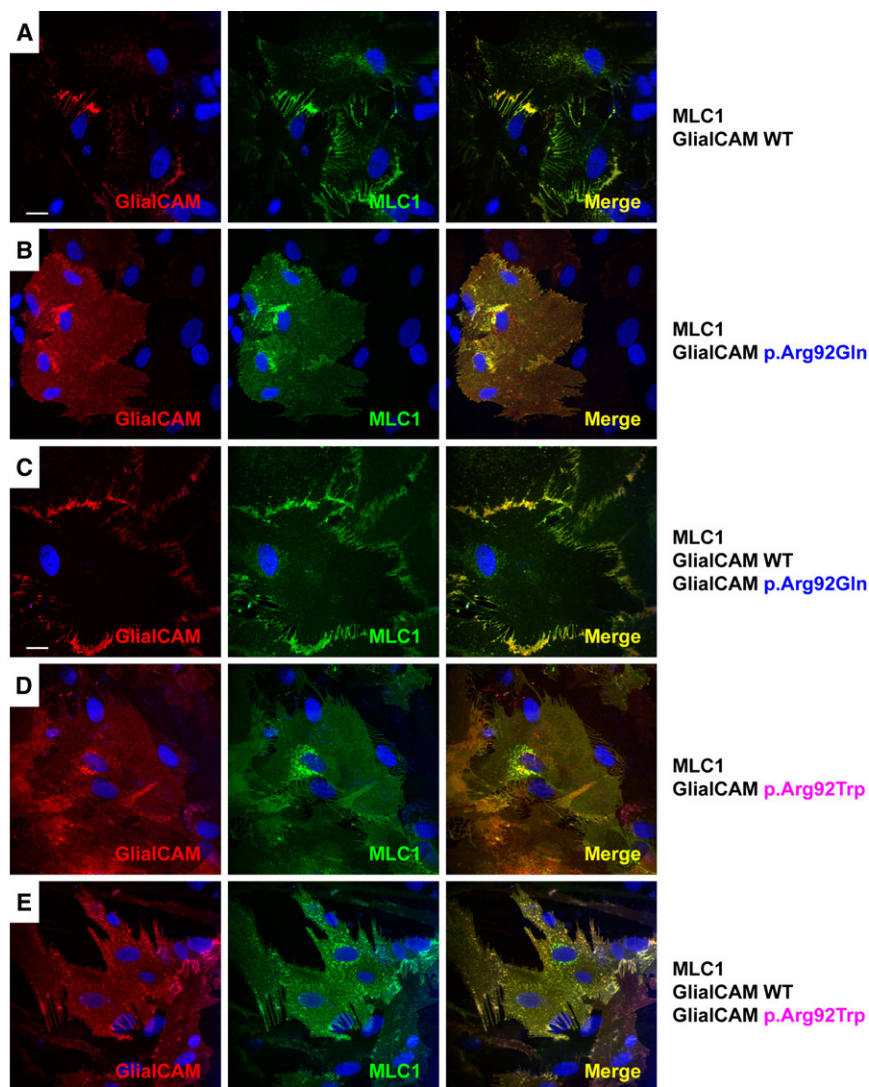
The scale bars indicate 50  $\mu$ m (A and D), 500 nm (B and C), and 10  $\mu$ m (F).

containing the dominant mutations p.Arg92Trp and p.Gly89Asp (Figures 4D and Figure S5D).

To address the mode of inheritance of the mutations biochemically, we performed experiments with equal levels of wild-type GlialCAM and GlialCAM containing a dominant or recessive mutation together with

was found for the mutation p.Ser196Tyr (Figure S5C). Similar mislocalization of MLC1 and GlialCAM was observed after coexpression of wild-type MLC1 and GlialCAM

MLC1. The localization of MLC1 and GlialCAM was analyzed by immunofluorescence. Coexpression of wild-type GlialCAM rescued the MLC1-trafficking defect caused



by GlialCAM with recessive mutations (Figures 4C and 4F and Figure S5B) but did not rescue the trafficking defect caused by GlialCAM with dominant mutations (Figures 4E and 4F and Figure S5E). No difference in protein levels was observed between the mutants and the wild-type (Figure S4), making it unlikely that the trafficking defect is due to gene-dosage effects.

#### Figure 4. MLC1 and GlialCAM Subcellular Localization Changes Caused by Recessive and Dominant GlialCAM Mutations in Primary Cultures of Astrocytes

(A–F) Astrocytes were coinfecting with adenoviruses expressing MLC1 and wild-type GlialCAM (A) or GlialCAM containing a recessive (B, p.Arg92Gln) or a dominant (D, p.Arg92Trp) MLC1-related mutation at MOI 3. In (C) and (E), cells were coinfecting with MLC1, wild-type GlialCAM, and GlialCAM containing the indicated mutation at a MOI ratio of 3:2:2. Cells were fixed, and permeabilized and then immunofluorescence was performed with a rabbit polyclonal antibody against human MLC1 (green) and a monoclonal antibody detecting GlialCAM protein (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Colocalization between the green and the red channel is shown in yellow. Images correspond to representative cells from four independent experiments. The scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ . (F) Random pictures from different experiments were taken. Quantification of the percentage of cells located in junctions (blue), not in junctions (red), or with a mixed phenotype (yellow, located partially in junctions and not in junctions) was performed manually. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean of four independent experiments. Bonferroni's multiple comparison test versus in junctions and not in junctions was used. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Representative images for the other mutations shown in the quantification are depicted in Figure S5.

#### Discussion

The leukodystrophy MLC is characterized by infantile-onset macrocephaly and delayed neurological deterioration. The diagnosis is based on MRI criteria.<sup>1</sup> In 2001, causative mutations of MLC were identified in *MLC1*, accounting for approximately 75% of the patients. The fact that genetic-linkage studies failed to identify a second gene was ascribed to further genetic heterogeneity.<sup>9,10</sup> We recently identified two presumably autosomal recessive, phenotypes among MLC patients without *MLC1* mutations,<sup>11</sup> corroborating the notion of genetic heterogeneity. We now show that the genetic heterogeneity does not involve the gene but the mode of inheritance. We circumvented the problem of genetic heterogeneity by using a proteomic approach. This method is validated by the discovery of *HEPACAM* (hepatic and glial cell adhesion molecule, MIM 611642) as a gene disrupted in MLC and



can be considered in the future to identify disease genes for other rare or genetically heterogeneous disorders.

We prefer the name GlialCAM above HepaCAM for the related protein. Although the protein was first isolated from liver and called HepaCAM,<sup>21</sup> it was subsequently found to be predominantly expressed in the central nervous system and was renamed GlialCAM.<sup>18</sup> In the present paper, we show that mutations in *HEPACAM* lead to a neurological phenotype without any sign of liver involvement.

That mutations in one gene cause both autosomal-recessive and -dominant disease is rare but not unique. It has been described for a few other genes, including *LMNA* (MIM 150330), *SOX18* (MIM 601618), *ANK1* (MIM 612641), *COL6A1* (MIM 120220), *PMP22* (MIM 601097), and *MPZ* (MIM 159440).<sup>22–27</sup> However, patients with the dominant mutations in these genes do not display an improving phenotype, as seen in our MLC patients with dominant *HEPACAM* mutations. In MLC, the macrocephaly and cerebral white-matter disease on MRI arise in the first year of life, the period of most rapid myelin deposition in the brain. Apparently, *MLC1* and GlialCAM exert their most important function during this process. The functions of both *MLC1* and GlialCAM are unknown. We, therefore, do not understand the mechanism of the improving phenotype for the dominant *HEPACAM* mutations. A hypothetical gene-dose effect is not supported by the finding that normal GlialCAM does not partially rescue the localization of the GlialCAM-*MLC1* complex in astrocytes expressing a dominant *HEPACAM* mutation. The dominant mutations are located in a putative pocket of the immunoglobulin domain and might disrupt interactions with GlialCAM itself and other unknown molecules.

GlialCAM acts as a *MLC1* beta subunit needed for its correct trafficking to cell-cell junctions. Probably, *cis*- or *trans*-interactions mediated by GlialCAM are necessary for its correct localization. The function of GlialCAM as an adhesion molecule suggests that both GlialCAM and *MLC1* have a role in the maintenance of correctly sealed cell-cell contacts. Interestingly, GlialCAM and not *MLC1* is detected in myelin, the place where most vacuoles are found in MLC.<sup>2</sup> GlialCAM is not obligatorily associated with *MLC1*, indicating that it might have other functions by itself or in association with other molecules. Recently, it has been suggested that *MLC1* interacts with the  $\beta 1$  subunit of the Na,K-ATPase pump.<sup>28</sup> We did not detect this protein in our affinity purifications. Further studies on *MLC1*-interacting proteins might provide better insights into the pathophysiology of MLC.

GlialCAM is an interesting protein. In 60% of the families with dominant *HEPACAM* mutations, the affected persons in fact display benign familial macrocephaly (MIM 153470). They have macrocephaly, but they are otherwise normal. MRI shows large but normal brains. The parents did not undergo MRI as children, and a transient leukoencephalopathy was not docu-

mented in any of them. Benign familial macrocephaly is most likely genetically heterogeneous, and *HEPACAM* is likely to be one of the related genes. Another interesting finding is that in 40% of the patients with a dominant *HEPACAM* mutation, macrocephaly, and mental retardation with or without autism, which are known to be associated features, persist.<sup>29</sup> This clinical syndrome is probably genetically heterogeneous, and specific *HEPACAM* mutations could cause it. The fact that single *HEPACAM* mutations might be associated with different phenotypes requires the geneticist to be cautious when counseling an affected family. From the age of approximately 2–3 years, the combination of clinical picture and MRI findings allows an accurate prediction of the phenotype.

In conclusion, we have found that *HEPACAM* is mutated in MLC. Recessive mutations cause a progressive leukodystrophy that is indistinguishable clinically and by MRI from the disease caused by recessive *MLC1* mutations. Dominant mutations can cause transient clinical and MRI features of MLC, benign familial macrocephaly, and the clinical syndrome of macrocephaly and mental retardation with or without autism.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include five figures and three tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

#### Acknowledgments

Research in our laboratories was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF) 2009-07014 (R.E.), Fundación Ramon Areces project (R.E.), European Leukodystrophy Association Foundation 2007-017C4 project (R.E. and M.S.v.d.K.), PS09/02672-ERARE (R.E.), ERARE grant 11-330-1024 (G.C.S. and M.S.v.d.K.), 2009 Grups de Recerca de Catalunya 719 (R.E.), SAF 2009-12606-C02-02 (V.N.), CIBERER INTRA08/750 (R.E. and V.N.), and 2009 SGR01490 (V.N.). M.S.v.d.K., G.C.S., and M.C.R. are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (TOP Grant 9120.6002), the Hersenstichting (Grants 13F05.04, 15F07.30 and 2009[2]-14), and the Optimix Foundation for Scientific Research. R.E. is a recipient of an ICREA Academia prize. We thank all colleagues who contributed MRI, clinical information, and blood samples. We thank Alejandro Barrallo, Michael Pusch, and Jim M. Powers for critical review of the manuscript.

Received: December 7, 2010

Revised: January 12, 2011

Accepted: February 21, 2011

Published online: March 17, 2011

#### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

ExonPrimer, <http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>

Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

SIFT, <http://sift.jcvi.org/>

## References

- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., and Valk, J. (1995). Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.* **37**, 324–334.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F., and Valk, J. (1996). Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.* **92**, 206–212.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Könst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., et al. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 831–838.
- Ilja Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C., and Pronk, J.C. (2006). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: An update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.* **27**, 505–512.
- Teijido, O., Martínez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Río, J.A., Palacín, M., and Estévez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2581–2594.
- Boor, P.K.I., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C., and van der Knaap, M.S. (2005). MLC1: A novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 412–419.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Soriano, E., Martínez, A., and Estévez, R. (2007). Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.* **26**, 532–545.
- Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **125B**, 31–37.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S., and Köhler, W. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics* **34**, 215–218.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbané, A., et al. (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* **61**, 534–537.
- 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., et al. (2010). Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Ann. Neurol.* **67**, 834–837.
- Zolles, G., Wenzel, D., Bildl, W., Schulte, U., Hofmann, A., Müller, C.S., Thumfart, J.O., Vlachos, A., Deller, T., Pfeifer, A., et al. (2009). Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron* **62**, 814–825.
- Duarri, A., Teijido, O., López-Hernández, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Martínez, A., et al. (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: Mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3728–3739.
- Norton, W.T., and Poduslo, S.E. (1973). Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J. Neurochem.* **21**, 749–757.
- Pandey, A., Andersen, J.S., and Mann, M. (2000). Use of mass spectrometry to study signaling pathways. *Sci. STKE* **2000**, pl1.
- Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., Tarusawa, E., Kulik, A., Unger, A., Ivankova, K., et al. (2010). Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**, 231–235.
- McCarthy, K.D., and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* **85**, 890–902.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B., and Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* **56**, 633–645.
- Spiegel, I., Adamsky, K., Eisenbach, M., Eshed, Y., Spiegel, A., Mirsky, R., Scherer, S.S., and Peles, E. (2006). Identification of novel cell-adhesion molecules in peripheral nerves using a signal-sequence trap. *Neuron Glia Biol.* **2**, 27–38.
- Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mössner, R., and Lesch, K.P. (2003). The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* **44**, 283–295.
- Chung Moh, M., Hoon Lee, L., and Shen, S. (2005). Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **42**, 833–841.
- Raffaele Di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., Romorini, A., Voit, T., Orstavik, K.H., Merlini, L., et al. (2000). Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1407–1412.
- Irrthum, A., Devriendt, K., Chitayat, D., Matthijs, G., Glade, C., Steijlen, P.M., Fryns, J.P., Van Steensel, M.A., and Vikkula, M. (2003). Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1470–1478.
- Eber, S.W., Gonzalez, J.M., Lux, M.L., Scarpa, A.L., Tse, W.T., Dornwell, M., Herbers, J., Kugler, W., Ozcan, R., Pekrun, A., et al. (1996). Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat. Genet.* **13**, 214–218.
- Lampe, A.K., and Bushby, K.M. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *J. Med. Genet.* **42**, 673–685.
- Roa, B.B., Garcia, C.A., Pentao, L., Killian, J.M., Trask, B.J., Suter, U., Snipes, G.J., Ortiz-Lopez, R., Shooter, E.M., Patel, P.I., and Lupski, J.R. (1993). Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Genet.* **5**, 189–194.
- Nicolaou, P., Zamba-Papanicolaou, E., Koutsou, P., Kleopa, K.A., Georghiou, A., Hadjigeorgiou, G., Papadimitriou, A.,

- Kyriakides, T., and Christodoulou, K. (2010). Charcot-Marie-Tooth disease in Cyprus: Epidemiological, clinical and genetic characteristics. *Neuroepidemiology* 35, 171–177.
28. Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T.C., and Ambrosini, E. (2011). The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: New insights into MLC pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 20, 90–103.
29. White, S., O'Reilly, H., and Frith, U. (2009). Big heads, small details and autism. *Neuropsychologia* 47, 1274–1281.





**Artículo aceptado en Mayo de 2011 en la  
revista HUMAN MOLECULAR GENETICS**



# Molecular mechanisms of *MLC1* and *GLIALCAM* mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts

Tania López-Hernández<sup>1,†</sup>, Sònia Sirisi<sup>1,5,†</sup>, Xavier Capdevila-Nortes<sup>1</sup>, Marisol Montolio<sup>1,6</sup>, Victor Fernández-Dueñas<sup>3</sup>, Gert C. Scheper<sup>8</sup>, Marjo S. van der Knaap<sup>8</sup>, Pilar Casquero<sup>9</sup>, Francisco Ciruela<sup>3</sup>, Isidre Ferrer<sup>4,10</sup>, Virginia Nunes<sup>2,5,7</sup> and Raúl Estévez<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Sección de Fisiología, <sup>2</sup>Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, <sup>3</sup>Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina and <sup>4</sup>Institut Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, Idibell-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, Centro de Investigación en Red de Enfermedades rara (CIBERER), Barcelona, Spain, <sup>6</sup>U-750 and <sup>7</sup>U-730: ISCIII, Valencia, Spain, <sup>8</sup>Department of Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, <sup>9</sup>Sección de Neurología, Hospital Mateu Orfila, Maó, Menorca, Spain and <sup>10</sup>CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas), ISCIII, Barcelona, Spain

Received April 12, 2011; Revised and Accepted May 22, 2011

**Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare leukodystrophy caused by mutations in *MLC1* or *GLIALCAM*. The *GLIALCAM* gene product functions as an *MLC1* beta-subunit. We aim to further clarify the molecular mechanisms of MLC caused by mutations in *MLC1* or *GLIALCAM*. For this purpose, we analyzed a human post-mortem brain obtained from an MLC patient, who was homozygous for a missense mutation (S69L) in *MLC1*. We showed that this mutation affects the stability of *MLC1* *in vitro* and reduces *MLC1* protein levels in the brain to almost undetectable. However, the amount of *GlialCAM* and its localization were nearly unaffected, indicating that *MLC1* is not necessary for *GlialCAM* expression or targeting. These findings were supported by experiments in primary astrocytes and in heterologous cells. In addition, we demonstrated that *MLC1* and *GlialCAM* form homo- and hetero-complexes and that MLC-causing mutations in *GLIALCAM* mainly reduce the formation of *GlialCAM* homo-complexes, leading to a defect in the trafficking of *GlialCAM* alone to cell junctions. *GLIALCAM* mutations also affect the trafficking of its associated molecule *MLC1*, explaining why *GLIALCAM* and *MLC1* mutations lead to the same disease: MLC.**

## INTRODUCTION

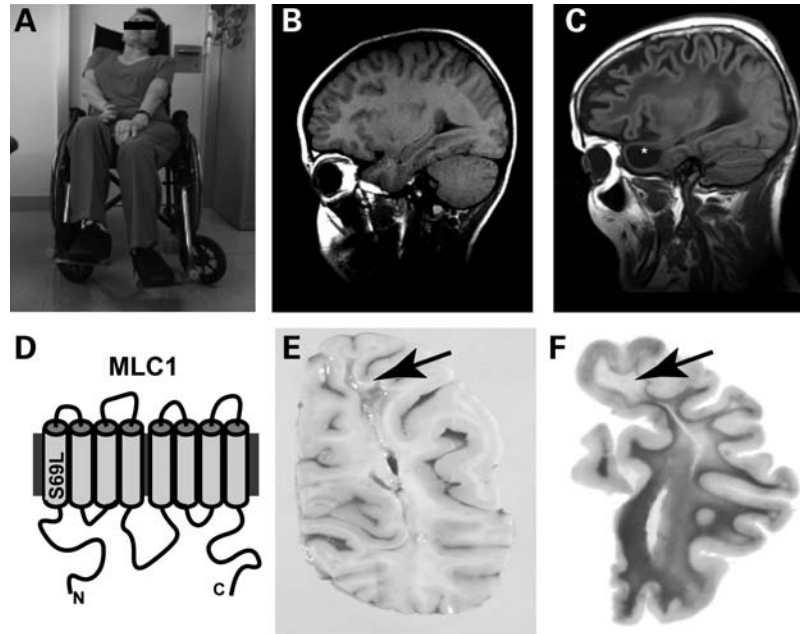
Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC, OMIM 604004) is a rare type of leukodystrophy (1), characterized by macrocephaly which appears during the first year of life. After several years, slow neurological deterioration with cerebellar ataxia and spasticity occurs. MRI reveals diffuse signal abnormality and swelling of the cerebral white matter and the presence of subcortical cysts, mainly in

the anterior temporal regions. Initial studies of a brain biopsy from an MLC patient showed that myelin is vacuolated (2). The first disease gene, named *MLC1*, was identified in 2001 (3). Mutations in *MLC1* have been identified in ~75% of the MLC patients (4).

*MLC1* is an oligomeric membrane protein that is expressed mainly in the brain and in white blood cells (WBCs) (3,5). Within the brain, *MLC1* is predominantly located in astrocyte–astrocyte junctions close to blood– and CSF–

\*To whom correspondence should be addressed at: Faculty of Medicine, Department of Physiological Sciences II, Campus de Bellvitge, Pavelló de Govern, C/Feixa Llarga s/n. 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34 934039781; Fax: +34 934024268; Email: restevez@ub.edu

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.



**Figure 1.** Characterization of an MLC patient. (A) Picture of the MLC-affected patient studied, which showed macrocephaly, motor clumsiness and ataxia. (B and C) Sagittal T1-weighted images of a control subject (B) and of the patient (C) showing subcortical cysts on frontal and temporal regions (asterisk) (D) A predicted 2D model of the MLC1 protein, showing the localization of the mutation (S69L) identified in this patient. (E) Gross coronal sections of the brain showing atrophy of the cerebral white matter with cavitation of the centrum semiovale and preservation of the cortico-cortical U-fibers, corpus callosum, anterior commissure, fornix and optic nerves. (F) Klüver–Barrera stain showed demyelination of the central white matter of the brain with preservation of the cortico-cortical U-fibers. Arrow points to an area with lack of myelin.

brain barriers, Bergmann glia and main axonal tracts (6–8). Knockdown of MLC1 in astrocyte cultures causes vacuolation (9). In a similar manner, re-examination of the brain biopsy from an MLC patient (2) revealed that vacuoles are also consistently present in astrocytic endfeet (9). A role of MLC1 in volume regulation of astrocytes has been suggested based on changes in its localization in hypo-osmotic conditions (10). However, functional data indicating the role of MLC1 are lacking.

Genetic information suggested that at least one other gene is involved in MLC (11,12), but genetic linkage studies and studies of candidate genes were negative (13). Recently, two different phenotypes were described among MLC patients without *MLC1* mutations: a classical phenotype which retains the typical clinical and MRI features, as seen in patients with *MLC1* mutations, and an improving phenotype which shows transient MLC features and lacks clinical deterioration (14).

Quantitative proteomic analysis of affinity-purified MLC1 revealed that GlialCAM (15) interacts directly with MLC1. GlialCAM is an Ig-like protein of unknown function (15,16). It was shown that *GLIALCAM*, also called *HEPACAM*, is the second MLC gene (17). Interestingly, MLC-causing *GLIALCAM* mutations are inherited in a recessive manner in patients with the classical phenotype, and in a dominant manner in patients with the improving phenotype (17).

Missense mutations in *MLC1* reduce MLC1 protein expression *in vitro* (5,18,19) and *in vivo*, as shown in WBCs (19), although no data are available from brain tissue of MLC patients with missense mutations. Studies in primary astrocytes indicate that most *GLIALCAM* mutations disrupt

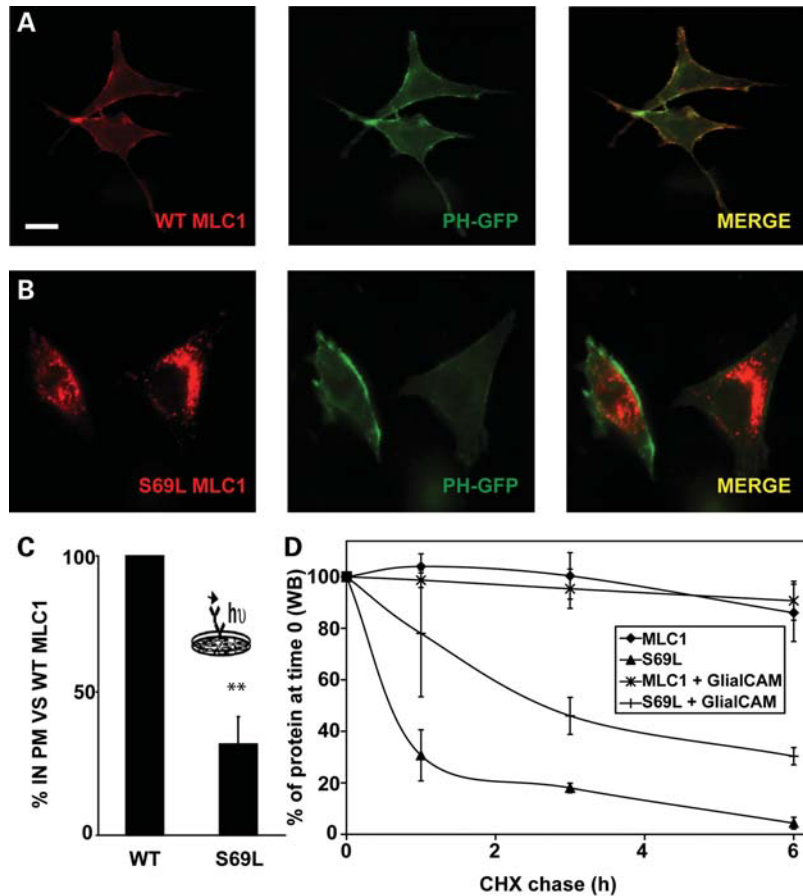
the normal localization of MLC1 and GlialCAM in astrocyte–astrocyte junctions (17), suggesting that their localization is crucial for physiological function.

In the present work, we present a more detailed characterization of the effect of mutations found in *MLC1* and *GLIALCAM*. The availability of a brain obtained at autopsy from an MLC patient homozygous for an *MLC1* missense mutation greatly facilitated our studies.

## RESULTS

### Studies on brain samples of an MLC patient

The patient studied was a female who developed a macrocephaly within the first few months of life and after several years experienced a slow motor deterioration, epilepsy and cognitive decline (Fig. 1A). MRI imaging at the age of 40 years [control (Fig. 1B) versus patient (Fig. 1C)] showed diffuse signal abnormalities in the cerebral white matter, with global atrophy and presence of subcortical cysts in the anterior temporal region, indicative of MLC. Analysis of the *MLC1* gene showed that the patient is homozygous for the mutation c.206C>T. The mutation leads to an amino acid change (S69L) in the predicted first transmembrane domain (Fig. 1D). DNA of the parents was not available to confirm that they both carry the same mutation. The amino acid change affects a residue that is highly conserved among different species. It has not been observed in 400 control chromosomes and it was detected in other patients with MLC (4), indicating that the mutation is most likely pathogenic. The patient died at the age of 57 years following a



**Figure 2.** *In vitro* studies of the defective protein S69L MLC1 with or without GlialCAM. (A and B) HeLa cells were co-transfected with PH-GFP, as a marker of plasma membrane, together with wild-type MLC1 (A) or the S69L-defective protein (B) containing two HA epitope tags. Two days after the transfection, cells were fixed and permeabilized, and immunofluorescence was performed using 3F10 (against the HA epitope tags) as a primary antibody. The bar line corresponds to 20  $\mu$ m. (C) HeLa cells were transfected with wild-type MLC1 or the S69L-defective protein with HA tags. Plasma membrane levels were measured using a luminescence-based method, as described in Materials and Methods. Data correspond to the average of three experiments, expressed as a percentage of the wild-type MLC1 protein.  $**P < 0.01$ . The inset shows an overview of the method. (D) Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with the protein synthesis inhibitor CHX (100  $\mu$ g/ml) for the times indicated (0, 1, 3 and 6 h). Cells were harvested, solubilized and processed by western blot against human MLC1. The signal was quantified using the Multigauge software (Fujifilm), and the values were normalized to the value at time 0 for each of the groups (wild-type MLC1, wild-type MLC1+GlialCAM, S69L, S69L+GlialCAM). The result corresponds to the average of three independent experiments. Values depicted are mean  $\pm$  SEM.

cranial trauma. With the consent of the family, brain autopsy was performed.

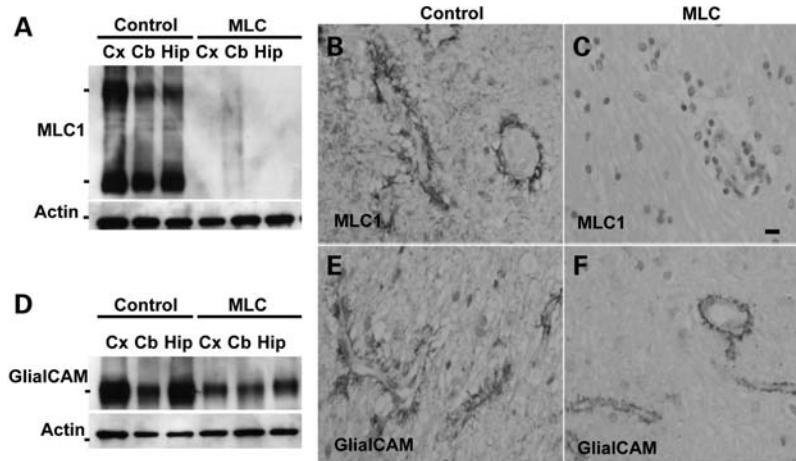
Gross examination of the brain revealed reduced cerebral white matter with cavitation in the frontal and parietal lobes (Fig. 1E). Subcortical U-fibers, internal capsule, corpus callosum, anterior commissure and optic nerves and tracts were better preserved. The cerebellar peduncles and cerebellar white matter appeared normal. Myelin stains confirmed the predominant involvement of the deep cerebral white matter with better preservation of the other white matter structures (Fig. 1F).

Microscopic examination (Supplementary Material, Fig. S1) revealed preservation of the cerebral cortex and alterations limited to the white matter. These alterations consisted of lack of myelin of the deep white matter with cavitation in the most affected areas, reduction in the number of astrocytes and oligodendrocytes and accompanying loss of axons. Many astrocytes in the white matter lacking myelin and in the vicinity of cavities contained  $\alpha$ B-crystallin, a stress protein. Rosenthal fibers were absent. Large numbers of corpora

amyloacea were found in the damaged white matter. Small and focal perivascular lymphocytes and macrophages were indicative of white matter damage (Supplementary Material, Fig. S1). We conclude that the degeneration and the infiltration of immune system cells observed in the MLC brain from the patient are mild.

#### *In vitro* studies of the mutation identified in the patient

We introduced the mutation S69L in human MLC1 containing two HA epitope tags, as already described (5). The first tag at the N-terminus allows detection by western blot and the second tag, which is located in an extracellular loop, allows detection of surface-expressed protein. Localization was assayed in HeLa cells after co-transfection with the GFP-tagged pleckstrin homology (PH) domain of the phospholipase C  $\delta$ 1 (PH-GFP), a fluorescent protein probe that specifically labels the plasma membrane. Wild-type MLC1 was mainly detected at the plasma membrane (Fig. 2A), co-localizing with



**Figure 3.** MLC1 and GlialCAM expression in brain tissue. (A) MLC1 expression is detected in solubilized extracts from the control brain, but it is nearly undetectable in extracts from the MLC patient. Actin was used as a loading control. Cx, cortex; Cb, cerebellum; Hip, hippocampus. The positions of the MLC1 monomer and dimer (36 and 72 kDa) and actin (53 kDa) are indicated on the left. (B and C) MLC1 immunoreactivity is found in astrocytic processes surrounding blood vessels in the normal brain. No MLC1 immunoreactivity is found in the brain from the MLC patient. (D) GlialCAM expression is detected in solubilized extracts from the control brain and from the MLC patient. Actin was used as a loading control. Cx, cortex; Cb, cerebellum; Hip, hippocampus. The positions of GlialCAM (72 kDa) and actin (53 kDa) are indicated on the left. (E) GlialCAM immunoreactivity is found in astrocytic processes surrounding blood vessels in control and MLC (F) brains. Paraffin sections were slightly counterstained with hematoxylin to stain nuclei. Magnification:  $\times 200$ . Scale bar: 40  $\mu\text{m}$ .

PH-GFP. In contrast, the S69L-MLC1-defective protein was almost exclusively detected in intracellular compartments (Fig. 2B). Surface expression levels of the defective protein were quantified using a luminescence-based method, which indicated that the defective protein had a reduced surface expression (Fig. 2C). In other MLC1 proteins containing MLC-causing mutations, it was shown that increased endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and endo-lysosomal-associated degradation (ELAD) contributed to the cell surface expression defect (19).

In these MLC1 pathogenic variants, reduced surface expression was a consequence of reduced stability (19). We therefore studied the protein stability of this variant in comparison with the wild-type protein, by measuring the remaining protein after incubation with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (Fig. 2D). Similarly, a reduced stability was detected for the defective S69L MLC1 protein. We also tested whether the stability of the wild-type and the defective protein S69L-MLC1 was altered by the co-expression of GlialCAM (Fig. 2D). The results showed that the S69L protein was stabilized by the presence of the GlialCAM molecule, but the defective protein still remained less stable than the wild-type (Fig. 2D).

### Expression studies of MLC1 and GlialCAM in the patient brain

With brain tissue from the MLC patient, we validated the *in vitro* results in native tissue. No apparent MLC1 protein signal was detected by western blot in cell lysates from different brain regions from the patient, whereas MLC1 was clearly detected in a control case (Fig. 3A). In the control brain, MLC1 immunoreactivity was found in astrocytic processes surrounding blood vessels (Fig. 3B). In contrast, no MLC1 immunostaining was detected in the brain from the MLC patient (Fig. 3C).

Similar experiments were performed for GlialCAM (17). Western blot experiments detected expression in the MLC patient (Fig. 3D). Quantification of GlialCAM levels in three independent experiments revealed a 40% decrease versus the control brain. However, it cannot be concluded that its expression was changed compared with the control case, as the post-mortem time differs. Immunohistochemistry detected GlialCAM in astrocytic processes surrounding blood vessels, and subventricular and subpial astrocytes in the control case [Fig. 3E and (17)] and in the brain of the MLC patient.

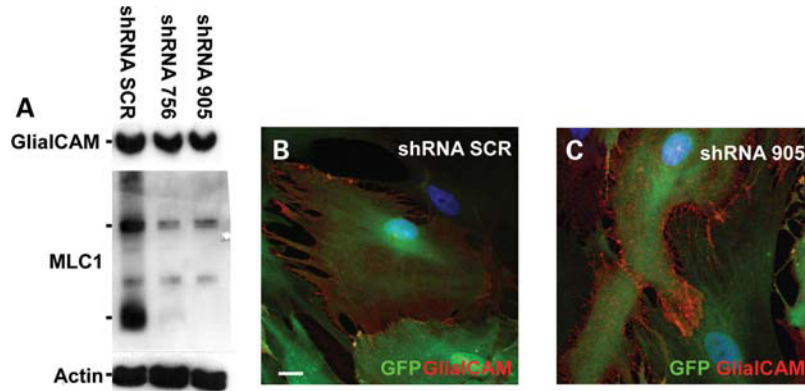
### Expression of GlialCAM in primary astrocytes depleted of MLC1 by RNA interference

We investigated the expression and localization of GlialCAM in primary cultures of astrocytes, which have been depleted of MLC1 by RNA interference (Fig. 4). Although knockdown of MLC1 was nearly complete, as confirmed by western blot, no changes in endogenous GlialCAM protein expression was found compared with control scrambled-shRNA (SCR)-infected astrocytes (Fig. 4A). GlialCAM was detected in astrocyte–astrocyte processes in both SCR-transduced (Fig. 4B) and MLC1-depleted astrocytes (shRNA 905) (Fig. 4C). Infection with adenovirus-expressing GlialCAM-flag in MLC1-depleted astrocytes also resulted in GlialCAM localization in astrocyte processes (data not shown). Overall, this result, together with the localization studies in the patient, suggests that the GlialCAM subcellular localization is independent of MLC1 expression.

### *In vitro* characterization of GlialCAM–MLC1 interaction

To further increase our understanding of the relationship between MLC1 and GlialCAM, several studies were done expressing both proteins in heterologous systems. Split-TEV (tobacco etch virus protease) interaction assays (20)





**Figure 4.** Expression and localization of GlialCAM in primary astrocytes depleted of MLC1 by RNA interference. (A) Seven days after shRNA (SCR: Scrambled or 756 and 905: against MLC1) adenovector-mediated expression, cell extracts were analyzed in western blot studies using antibodies against GlialCAM and MLC1. Actin was used as a loading control. The result is a representative experiment of three independent experiments. The positions of the MLC1 monomer and dimer (36 and 72 kDa), GlialCAM (72 kDa) and actin (53 kDa) are indicated on the left. (B and C) At the same time after transduction, astrocytes were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies against GlialCAM. Transduced cells were visualized by the positive GFP signal. Scale bar: 20  $\mu$ m.

demonstrated that MLC1 homo-oligomerizes, but also hetero-oligomerizes, with GlialCAM (Fig. 5A). As controls, no interaction was detected with the unrelated proteins 4F2hc [a single transmembrane protein as GlialCAM (21)] and with the adenosine  $A_{2A}$  receptor [ $A_{2A}R$ , a polytopic membrane protein as MLC1 (22)]. In the reverse experiment, GlialCAM homo-oligomerizes, as described earlier (23), and hetero-oligomerizes with MLC1, but does not interact with the control unrelated proteins 4F2hc and  $A_{2A}R$  (Fig. 5A).

Additionally, we assessed the formation of MLC1 and GlialCAM hetero-complexes by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments. HEK-293T cells were transiently transfected with MLC1 and GlialCAM tagged with a FlAsH epitope and cyan fluorescent protein (CFP), respectively (MLC1<sup>FlAsH</sup> and GlialCAM<sup>CFP</sup>). The GlialCAM<sup>CFP</sup>/MLC1<sup>FlAsH</sup> hetero-oligomer formation caused FRET between the fluorescent proteins (Fig. 5B, left panel). Significant FRET was not observed in cells expressing only glialCAM<sup>CFP</sup> or co-expressing glialCAM<sup>CFP</sup> with the negative controls YFP and  $A_{2A}R^{YFP}$  (Fig. 5B, right panel). Thus, both methods (split-TEV and FRET), together with previously reported co-immunoprecipitation experiments (17), indicate that GlialCAM and MLC1 interact directly, although every method has different sensitivity.

Next, we addressed whether GlialCAM expression modified the surface levels of the MLC1 protein. Using a luminescence-based assay, the levels of MLC1 at the plasma membrane were investigated in transfected cells expressing MLC1 with an extracellular HA epitope, in the presence or absence of GlialCAM. These studies revealed that expression of GlialCAM did not modify MLC1 surface levels (Fig. 5C).

Both MLC1 and GlialCAM were reported to be located in tissue in astrocyte–astrocyte junctions (6,17). In HeLa cells, MLC1 was detected at the plasma membrane [Fig. 5D and (5)], but not particularly enriched in cell junctions, as illustrated by the intensity profile of the associated fluorescence (Fig. 5D, inset). In contrast, GlialCAM expressed alone was clearly detected in most cells in junctions (Fig. 5E, inset), as reported previously (16,23). Interestingly, after co-expression

of MLC1 with GlialCAM, both molecules were clearly enriched at cell junctions (Fig. 5F and G). Quantification of intensity profile calculations revealed that both GlialCAM and MLC1 are enriched at cell junctions in the presence of the other, but GlialCAM does not need MLC1 to be located in cell junctions (Fig. 5).

#### GlialCAM-defective proteins showed a reduced tendency to homo-oligomerize

Next, we aimed to analyze the molecular consequences of MLC-causing *GLIALCAM* mutations in its oligomerization abilities. Using the split-TEV interaction assay, it was shown that all defective proteins except S196Y had a lower tendency to homo-oligomerize than with the wild-type protein (Fig. 6A).

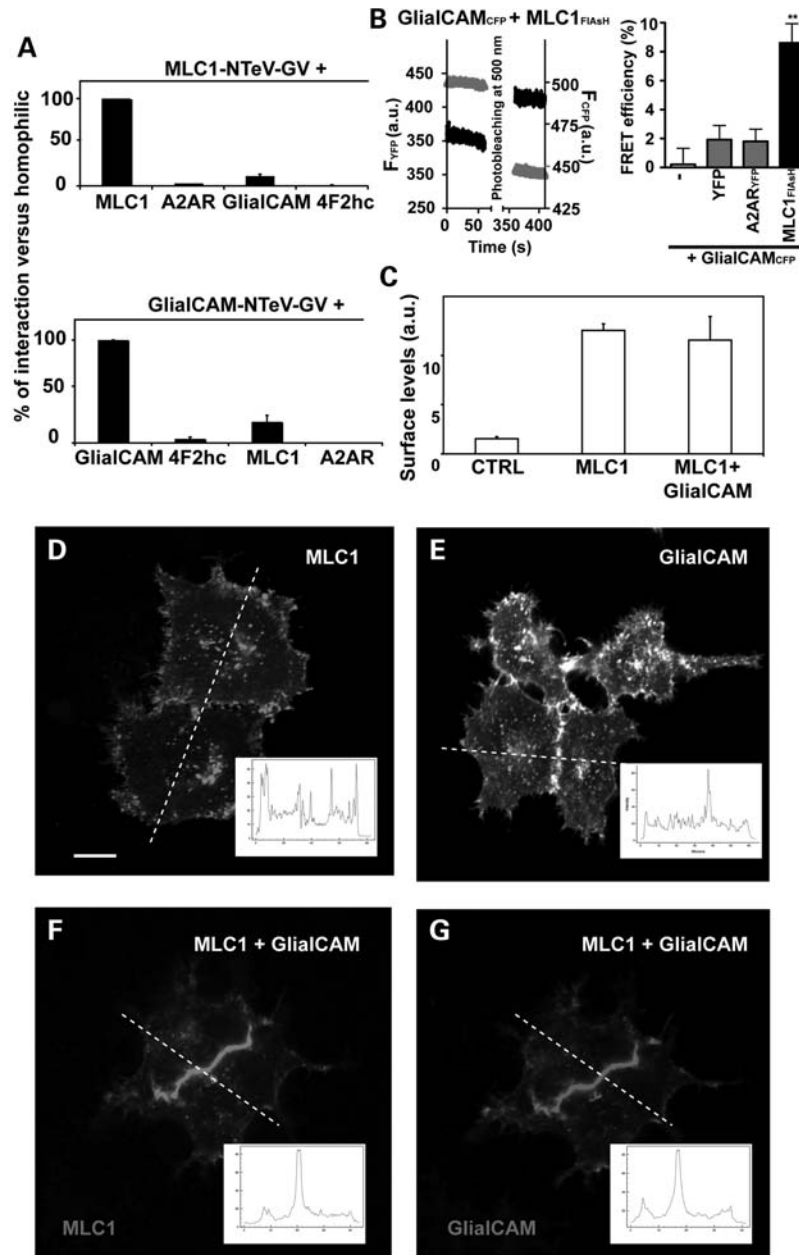
We subsequently studied whether GlialCAM-defective proteins affected the direct protein–protein interaction with MLC1 (Fig. 6B). Although the recessive pathogenic variants R92Q and R98C showed a reduction in their ability to hetero-oligomerize, the proteins containing the recessive mutation S196Y or the dominant mutations R92W and G89D still retained the capacity to oligomerize with MLC1 at similar levels as the wild-type protein.

#### GlialCAM-defective proteins show a trafficking defect independent of MLC1

As the mutations mainly affect the ability of GlialCAM to homo-oligomerize, then the question was whether the MLC-causing *GLIALCAM* mutations would affect the localization of GlialCAM *per se*.

In HeLa cells, wild-type GlialCAM mainly shows two localization patterns: at the plasma membrane (Fig. 7A) and in junctions (Figs 5E and 7B). Typical examples for different proteins containing recessive and dominant mutations expressed in HeLa cells are shown in Figure 7C–G. Multiple pictures from different experiments were taken and the percentage of cells in which GlialCAM was located either in junctions or not in junctions or intracellularly was quantified for

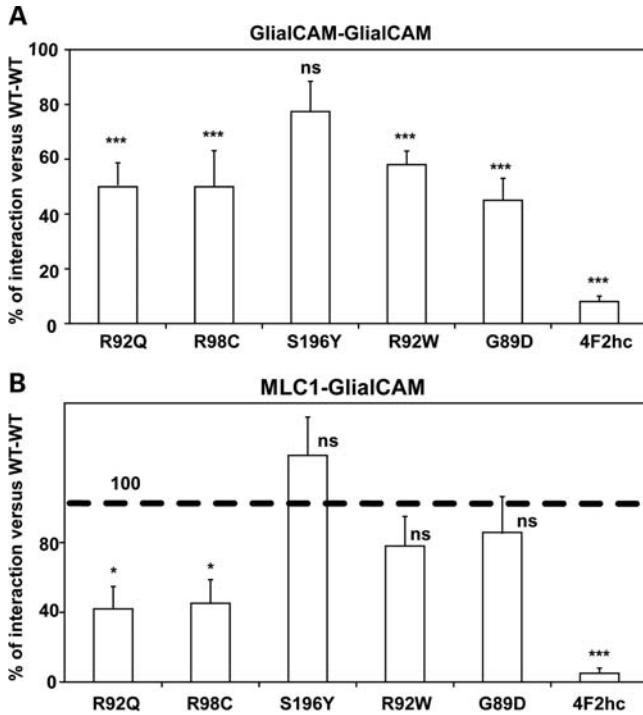




**Figure 5.** *In vitro* characterization of the interaction between MLC1 and GlialCAM. (A) HeLa cells were co-transfected with the indicated constructs, and interaction was monitored by split-TEV assays as described in Materials and Methods. The signal that was obtained for homo-oligomerization of MLC1 (upper panel) or GlialCAM (lower panel) was set to 100%. The result is the summary of five independent experiments. (B) Determination of the MLC1 and GlialCAM association by FRET experiments in living cells. Effect of photobleaching (left panel). Emission intensities of FlAsH (535 nm, green) and CFP (480 nm, blue) recorded from single cells co-expressing MLC1<sup>FlAsH</sup> and GlialCAM<sup>CFP</sup> using fluorescence microscopy. Emission intensities were recorded before and after FlAsH (the acceptor fluorophore) was photobleached by 5 min exposure to light at 500 nm. FRET efficiency (right panel) from cells expressing: GlialCAM<sup>CFP</sup> ( $n = 6$ ), GlialCAM<sup>CFP</sup> and YFP ( $n = 6$ ), GlialCAM<sup>CFP</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> ( $n = 6$ ), and GlialCAM<sup>CFP</sup> and MLC1<sup>FlAsH</sup> ( $n = 10$ ); data indicate mean  $\pm$  SEM and the double-asterisk indicates statistically significant differences ( $P < 0.01$ ; Student's *t*-test). (C) HeLa cells were transfected with wild-type MLC1 with HA tags or wild-type MLC1 together with GlialCAM. Plasma membrane levels were measured using a luminescence-based method, as described in Materials and Methods. Data correspond to the average of three experiments. (D–G) HeLa cells were transfected with plasmids expressing wild-type MLC1 (D), wild-type GlialCAM flag-tagged (E) or wild-type MLC1 plus wild-type GlialCAM flag-tagged (F and G). Cells were fixed and permeabilized and then immunofluorescence was performed using rabbit polyclonal antibodies against human MLC1 and flag monoclonal antibodies detecting GlialCAM protein. Scale bar: 20  $\mu$ m. Pairs of cells were analyzed performing an intensity profile through the indicated white dashed line. The result of this profile is shown as an inset in every case. The analysis revealed that MLC1 alone had an *R*-value (see Materials and Methods) of  $1.08 \pm 0.06$  ( $n = 45$ ), and MLC1 in the presence of GlialCAM had a value of  $3.95 \pm 0.06$  ( $n = 42$ ). On the other hand, GlialCAM alone had a value of  $2.43 \pm 0.15$  ( $n = 44$ ), and GlialCAM in the presence of MLC1 had a value of  $3.99 \pm 0.23$  ( $n = 42$ ).

each of the variants. As depicted in Figure 7H, GlialCAM-defective proteins showed an altered trafficking compared with wild-type GlialCAM, being located preferentially at the

plasma membrane but not in cell junctions. Similar results were found in primary cultures of astrocytes (Supplementary Material, Fig. S2). No defect was observed for the GlialCAM



**Figure 6.** MLC-causing *GLIALCAM* mutations affect the interaction mainly between GlialCAM molecules. HeLa cells were co-transfected with the indicated constructs, and interaction was monitored by split-TEV assays as described in Materials and Methods. The signal that was obtained for homo-oligomerization of wild-type GlialCAM (upper panel) or the hetero-oligomerization of MLC1 and wild-type GlialCAM (lower panel) was set to 100%. Bars indicate the percentage of interaction compared with the interaction between the corresponding wild-type proteins  $\pm$  SEM. The result is the summary of five independent experiments. Bonferroni's multiple comparison test was used. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . ns, no significant difference. Statistical significance was probably minor in the heteromeric interaction (MLC1–GlialCAM) compared with the homomeric interaction (GlialCAM–GlialCAM), as the fold signal induction in the split-TEV assays was higher in the homomeric studies.

protein containing the mutation S196Y in HeLa cells (Fig. 7) and in astrocytes (Supplementary Material, Fig. S2).

We investigated whether the localization of MLC1 in junctions when co-expressed in HeLa cells with GlialCAM was altered by the mutations in *GLIALCAM*. We found that MLC1 was also mislocalized (Fig. 8) in all studied GlialCAM-defective proteins, except the S196Y variant.

## DISCUSSION

Studies on *MLC1* missense mutations indicate that a deficiency of cell-surface MLC1 protein expression is the molecular basis of MLC disease (19). This hypothesis has been reconfirmed by the present studies on brain tissue from an MLC patient.

Interestingly, the MLC patient studied here was the oldest MLC patient to our knowledge. However, MLC1 protein was undetectable in the brain of the patient. The lack of detailed clinical data for all the MLC patients limits possible correlations between protein expression and the phenotype of each patient. Possible genotype–phenotype correlations are also difficult to estimate due to the high intrafamilial

phenotypic variability (24), the slow progression of the disease and the fact that the disease phenotype may worsen abruptly after trauma or infections. We conclude that, in MLC disease, no correlation can be established between the cellular or clinical phenotype and the genotype. Probably, unknown modifier factors could influence the phenotype.

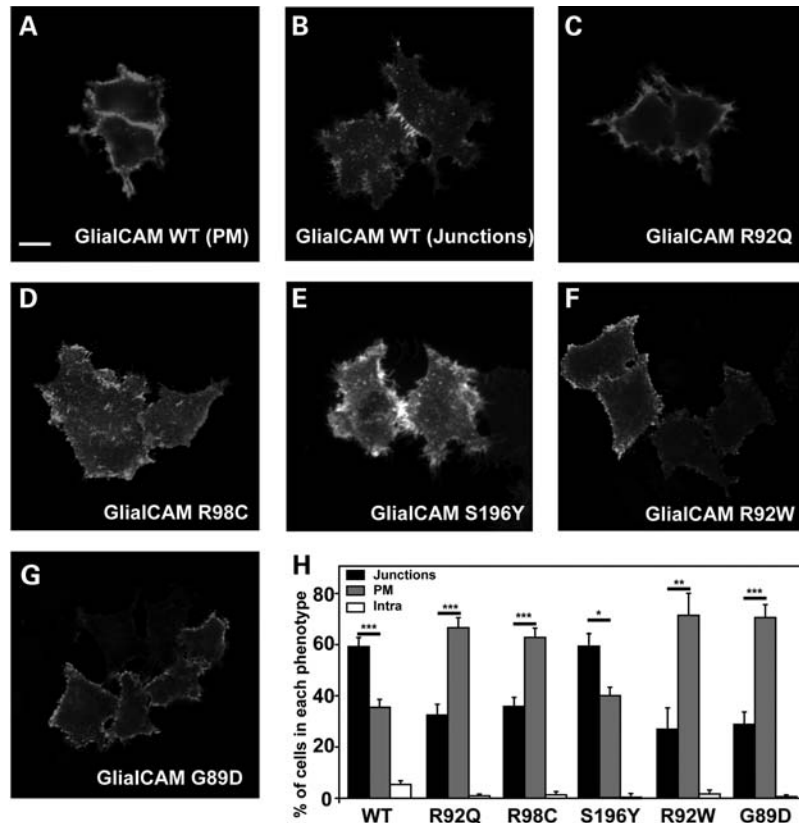
GlialCAM was identified as a beta-subunit of MLC1 (17). The present work defines the role of GlialCAM as an escort molecule, necessary to bring MLC1 to cell–cell junctions.

In the MLC patient and in astrocytes depleted of MLC1 by RNA interference, the expression and localization of GlialCAM are independent of MLC1. GlialCAM molecules may form complex structures involving homo-*cis*, hetero-*cis* and *trans*-interactions with itself and with other molecules (25,26). Here, we show that recessive and dominant *GLIALCAM* mutations affect mainly the formation of homo-oligomeric structures, leading to a trafficking defect. An exception is the S196Y protein variant, for which we have not found any defect. Collectively, the results presented here indicate a direct correlation between the GlialCAM homo-oligomerization and the subcellular localization of this protein in cellular junctions, suggesting that GlialCAM homo-oligomerization is a prerequisite for correct targeting. Defective GlialCAM-MLC1 hetero-oligomerization is differentially affected by several *GLIALCAM* mutations, but it could also contribute to the trafficking defect of MLC1, as MLC1 alone is not able to reach cell–cell junctions.

At present, we do not understand why some mutations behave as recessive and others as dominant. As all dominant mutations identified so far are located in a putative pocket of the immunoglobulin variable domain (17), we could speculate that these mutations may affect *trans*-interactions between GlialCAM molecules or other unknown proteins, although experimental evidence is lacking.

GlialCAM protein has been also identified as a molecule with a role in cell growth, differentiation, motility and adhesion in various cell types (15,16,23,27–30). It could be suggested that these functions of GlialCAM are affected in MLC patients. Whether MLC1 cooperates with GlialCAM in these functions needs to be explored. The biology of the GlialCAM protein could facilitate the understanding of other discoveries that have been obtained about the cell biology of MLC1. For instance, MLC1 was reported to be associated with caveolae (31), and GlialCAM was shown to be associated with caveolin 1 (32). Furthermore, localization of MLC1 in astrocytes was found to be dependent on the actin cytoskeleton (9), whereas GlialCAM was also shown to have a direct interaction with actin (28). Whether the oligomerization state of GlialCAM molecules is necessary for interaction with intracellular complexes which may be important for its localization in cell junctions is an interesting hypothesis that should be tested. In this sense, affinity purification studies revealed co-immunoprecipitation between MLC1 and the junction-associated protein ZO-1 (9).

In summary, this work offers new interesting clues about the pathogenic mechanism of *MLC1* and *GLIALCAM* mutations. We have shown that the MLC1 protein containing the S69L mutation can be stabilized by the presence of GlialCAM. Probably, GlialCAM increase the stability of the defective protein by protecting from the ERAD or the ELAD mechanisms. These data suggest that a therapeutic strategy aimed



**Figure 7.** Trafficking defect of GlialCAM-defective proteins expressed in HeLa cells. HeLa cells were transfected with plasmids expressing flag-tagged wild-type GlialCAM (A and B) or containing recessive [R92Q (C), R98C (D), S196Y (E)] or dominant [R92W (F), G89D (G)] MLC-causing mutations. Cells were fixed and permeabilized and then immunofluorescence was performed using flag monoclonal antibodies detecting GlialCAM protein. Scale bar: 20  $\mu$ m. (H) Pairs of cells were analyzed manually and quantified as being in junctions, around the plasma membrane or intracellularly. Intensity profile analysis was used to discern between junctional and plasma membrane localization. Data represent the mean of 4–11 independent experiments, corresponding to 954 cells (GlialCAM,  $n = 11$ ), 744 cells (R92Q,  $n = 5$ ), 644 cells (R98C,  $n = 5$ ), 718 cells (S196Y,  $n = 5$ ), 460 cells (R92W,  $n = 4$ ) and 433 cells (G89D,  $n = 4$ ). Bonferroni's multiple comparison test versus 'in junctions' and not 'in junctions' was used. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

at the over-expression of GlialCAM may be beneficial to improve the surface expression of MLC1 protein variants containing MLC-causing mutations, which could be envisaged as new therapies to MLC patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal experimentation and human samples

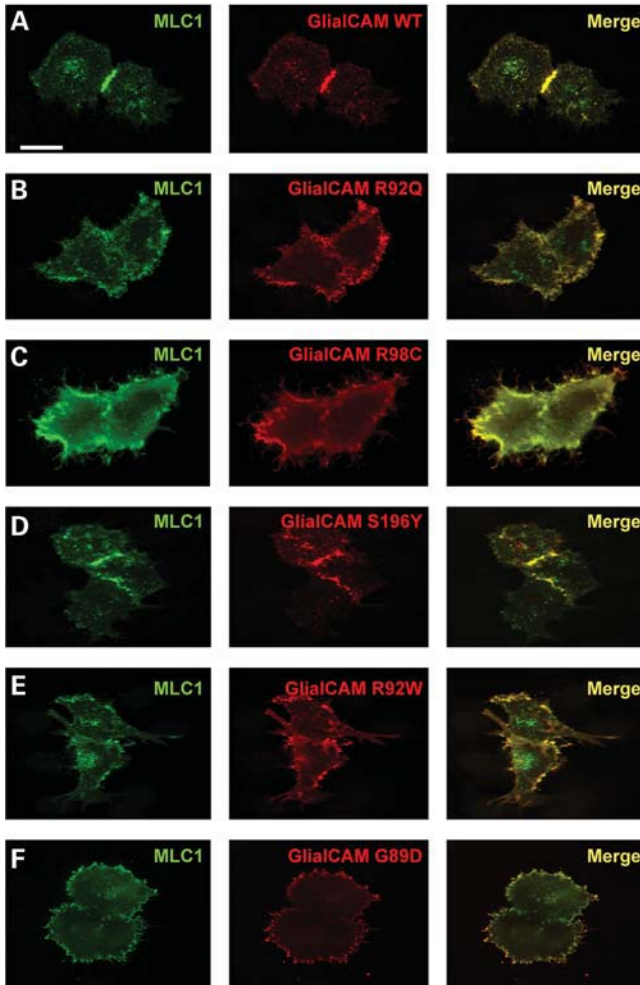
All the experimental protocols have been approved by the Animal Care and Ethics Committee of the University of Barcelona and conformed to the rules set by the Government of Catalunya.

### Neuropathological study in a patient's brain sample

The post-mortem delay was 34 h. At autopsy, one hemisphere was cut in coronal sections, 1 cm thick, frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The other hemisphere was fixed by immersion in 4% buffered formalin for 3 weeks. Selected samples were embedded in paraffin. De-waxed sections were stained with hematoxylin and eosin and Klüver–Barrera, or processed for immunohistochemistry. After incubation with methanol and normal serum, the sections were incubated

with one of the primary antibodies overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibodies to glial fibrillary acidic protein (Dako, Barcelona, Spain),  $\beta$ -amyloid (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain) and ubiquitin (Dako) were used at dilutions of 1:250, 1:50 and 1:200, respectively. CD68 (Dako), used as a marker of microglia, was diluted at 1:100. AT8 antibody (Innogenetics, Barcelona, Spain) was used at a dilution of 1:50. Anti-phosphorylated neurofilament antibody RT97 (Boehringer-Ingelheim) was used at a dilution of 1:100. Rabbit polyclonal anti- $\alpha$ -synuclein antibody (Chemicon, Barcelona, Spain) was used at a dilution of 1:3000. TDP-43 was examined using a mouse monoclonal antibody (Abnova, Tebu-Bio, Barcelona, Spain) raised against a full-length recombinant human TARDBP at a dilution of 1:1000. Monoclonal anti- $\alpha$ B-crystallin (Novocastra) was utilized at 1:50 (Stressgen, Bionova, Madrid, Spain). Antibodies to MLC1 (19) and GlialCAM (17) were used, both diluted 1:100. Following incubation with the primary antibody, the sections were incubated with EnVision+ system peroxidase (Dako) for 15 min at room temperature (RT). The peroxidase reaction was visualized with diaminobenzidine and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Control of the immunostaining included omission of the primary antibody; no signal was obtained following incubation with only the secondary antibody. Sections were slightly counterstained with hematoxylin.





**Figure 8.** MLC1 follows GlialCAM localization in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with plasmids expressing wild-type MLC1 and flag-tagged wild-type GlialCAM (A) or containing recessive [R92Q (B), R98C (C), S196Y (D)] or dominant [R92W (E), G89D (F)] MLC1-causing mutations. Cells were fixed and permeabilized and immunofluorescence was performed using rabbit polyclonal antibodies against human MLC1 (green) and flag monoclonal antibodies detecting GlialCAM protein (red). Co-localization is shown in yellow (Merge). The images represent typical examples of these experiments. Using different images from four to eight independent experiments, the localization of MLC1 was studied. MLC1 (with GlialCAM) was detected in  $71.5 \pm 3.6\%$  in junctions versus  $25.3 \pm 3.6\%$  at the plasma membrane (646 cells), MLC1 (with GlialCAM R92Q) was detected in  $41.9 \pm 4.4\%$  in junctions versus  $54 \pm 6\%$  at the plasma membrane (697 cells), MLC1 (with GlialCAM R98C) was detected in  $48.4 \pm 4.8\%$  in junctions versus  $51.4 \pm 4.8\%$  at the plasma membrane (688 cells), MLC1 (with GlialCAM S196Y) was detected in  $62.5 \pm 4\%$  in junctions versus  $37.5 \pm 4\%$  at the plasma membrane (281 cells), MLC1 (with GlialCAM R92W) was detected in  $35.6 \pm 4.5\%$  in junctions versus  $63.8 \pm 4.8\%$  at the plasma membrane (455 cells), MLC1 (with GlialCAM G89D) was detected in  $43.8 \pm 2.8\%$  in junctions versus  $56.2 \pm 2.8\%$  at the plasma membrane (444 cells). Scale bar:  $20 \mu\text{m}$ .

### Genetic analyses of MLC1 mutations

Sequence analysis of MLC1 exons and their surrounding intronic regions was carried out on genomic DNA extracted from blood, as described (4).

### Molecular biology

A tetracysteine epitope, compatible with the fluorescein arsenical helix binder (FIAsH) staining method, was introduced at the N-terminus of human MLC1, thus resulting in the following sequence: MAFLNCCPGCCMEPF (tetracysteine epitope is in boldface). This epitope tag did not affect the subcellular localization and the surface expression levels of the tagged protein (data not shown). Plasmids presented herein were made using standard molecular biology techniques employing recombinant PCR and the MultiSite Gateway System (Invitrogen). The integrity of all cloned constructs was confirmed by DNA sequencing.

### Cell culture and transfection

HEK-293T or HeLa cells were grown at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere of  $5\% \text{CO}_2$  in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with  $1 \text{ mM}$  sodium pyruvate,  $2 \text{ mM}$  L-glutamine,  $100 \text{ U/ml}$  streptomycin,  $100 \text{ mg/ml}$  penicillin and  $5\% \text{ (v/v)}$  fetal bovine serum. The cells were seeded into plates containing or not poly-D-lysine-coated cover slips. Cells were transiently transfected with the corresponding cDNA constructs using Transfectin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and following the manufacturer's instructions.

### Measurement of surface expression in cells by luminescence

Surface expression in transfected mammalian cells was performed as previously described (5). Briefly, 48 h after transfection, cells were cleaned with PBS and fixed with  $3\%$  paraformaldehyde. After PBS washing, cells were then blocked with  $1\%$  BSA in PBS for 30 min, and incubated with  $1 \text{ ml}$  of  $3\text{F10}$  anti-HA antibody at  $0.2 \mu\text{g/ml}$  in blocking solution for 1 h at RT. Cells were washed six times with blocking solution, and incubated for 20 min with  $1 \text{ ml}$  of a  $1:1000$  dilution horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (donkey anti-rat IgG, Jackson, Suffolk, UK) in blocking solution. Cells were washed four times with blocking solution and eight times with PBS. Luminescence was measured of one dish at a time with  $500 \mu\text{l}$  of Power Signal ELISA solution (Pierce) in a Turner TD-20/20 luminometer (Turner Biosystems, Madison, WI, USA).

### Split-TEV method

Split-TEV assay was performed as described (20,33) but with some modifications. To this end, a mutant form of the TEV protease (S219V) was used, which prevents its self-digestion but does not affect its catalytic efficiency. The oligopeptide substrate used as the TEV protease-recognition site was ENLYFQS, and the chimeric transcription factor used was GV (obtained from the pM3-VP16 vector; Clontech, Nucliber, Madrid, Spain), which contains the yeast Gal4DNA-binding domain and the herpes simplex VP16 transactivation domain. After TEV protease cleavage, GV translocates into the nucleus and induces the reporter Gaussia luciferase gene

expression (pNEBr-X1Gluc) (New England BioLabs, IZASA, Barcelona, Spain), which is secreted into the cell culture medium.

TEV protease was divided in two fragments: the TEV-N (residues 1–118) and the TEV-C (residues 119–242). We fused the TEV-N fragment, the TEV protease-recognition site and the chimeric transcription factor GV to the C-terminal of MLC1 and GlialCAM in a pCDNA3 vector containing a CMV promoter. In addition, we fused the TEV-C fragment to the C-terminal of MLC1, GlialCAM wild-type, GlialCAM containing the mutations R92Q, R98C, S196Y, R92W and G89D, and the adenosine 2A receptor (A2AR). The fusion of the TEV-C fragment to 4F2hc was done at the N-terminus. All the proteins with the TEV-C fragments were cloned in a pCDNA6.2/V5-pL Dest, containing the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, to provide low-to-moderate levels of expression.

All the expression plasmids were constructed by PCR using a polymerase with proofreading (KOD Hot Start polymerase, Calbiochem, Darnstadt, Germany), adding the attB1, attB2, attB5R or attB5 recombination sites compatible with the MultiSite Gateway System (Invitrogen). All protocols were performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

HeLa cells were transiently transfected with the corresponding cDNA constructs. The total DNA transfected was 2  $\mu$ g, with the following ratios: 0.75  $\mu$ g of each protein containing the TEV-N and the TEV-C fragments, 0.3  $\mu$ g of the reporter vector pNEBr-X1GLuc and 0.2  $\mu$ g of the pCMV- $\beta$ Gal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 h, 20  $\mu$ l of liquid were removed from the supernatant of the cells and Gaussia luciferase activity was measured in a TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems), after the addition of 20  $\mu$ M native colenterazine. To normalize the data, cells were solubilized and 30  $\mu$ l of the cell lysates were used to measure the  $\beta$ -galactosidase enzyme activity, using the Luminescent  $\beta$ -Galactosidase Detection Kit II (Clontech) in the same luminometer.

### FlAsH labeling

FlAsH labeling was performed as described (34). In brief, transfected cells growing on poly-D-lysine-coated cover slips were washed three times with phenol red-free Hank's balanced salt solution (HBSS) with glucose containing (in mM): 137 NaCl, 0.34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 KCl, 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.4 MgSO<sub>4</sub>, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 D-glucose and 1 ascorbic acid (pH 7.4 with NaOH), and then incubated at 37°C for 1 h with an HBSS solution containing 500 nM FlAsH/EDT<sub>2</sub>. FlAsH was purchased from Invitrogen and 1,2-ethanedithiol (EDT) from Sigma-Aldrich. Subsequently, to reduce non-specific labeling, cells were washed once with HBSS containing 250  $\mu$ M EDT for 10 min at 37°C, and thereafter rinsed three times with HBSS to reduce remnants of EDT.

### FRET experiments

FRET between CFP and FlAsH in cells expressing the corresponding constructs was determined by donor recovery after acceptor photobleaching, in which FRET is revealed as a significant increase in the fluorescence of the donor (i.e. CFP)

after photobleaching of the acceptor (i.e. FlAsH) (35). FlAsH-labeled cells were mounted in an Attofluor holder and placed on an inverted Axio Observer microscope (Zeiss Microimaging, Oberkochen, Germany) equipped with a 63 $\times$  oil immersion objective and a dual-emission photometry system (TILL Photonics, Gräfelfing, Germany). A Polychrome V (TILL Photonics) was used as the light source and signals detected by photodiodes were digitized using a Digidata 1440A analog/digital converter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). pCLAMP (Molecular Devices) and GraphPad Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA) software were used for data collection and analysis. Therefore, upon excitation at  $436 \pm 10$  nm [beam splitter dichroic long-pass (DCLP) 460 nm] and an illumination time set to 10 ms at 10 Hz, the emission light intensities were determined at  $535 \pm 15$  nm (FlAsH) and  $480 \pm 20$  nm (CFP<sub>pre</sub>) with a beam splitter DCLP of 505 nm. No corrections for spillover between channels or direct YFP excitation were made. Subsequently, acceptor photobleaching was performed by direct illumination of FlAsH at 500 nm for 5 min. Finally, the emission intensities of FlAsH and CFP (CFP<sub>post</sub>) were recorded again. FRET efficiency was calculated according to the equation:  $\text{FRET}_{\text{efficiency}} = 1 - (\text{CFP}_{\text{pre}}/\text{CFP}_{\text{post}})$ .

### Primary culture and adenoviral transduction

Rat primary astrocyte cultures were prepared as described previously (17). Construction of adenovirus-expressing wild-type HA-tagged human MLC1 has been described (19). Adenoviruses expressing human GlialCAM fused to three copies of the flag epitope, either wild-type or containing the recessive mutations R92Q, R98C and S196Y, or the dominant mutations R92W and G89D have been described recently (17). Transduction of astrocytes was performed as already described (19).

### Immunofluorescence and immunohistochemical studies

Immune sera against N-terminal mouse MLC1 and the N4 anti-N-terminus of human MLC1 antibody were generated and characterized previously (5,6,19). Immune sera against a GlialCAM synthetic peptide have also been described recently (17).

Tissue immunohistochemistry was performed as previously described (5,6). For immunofluorescent staining of cells, these were fixed with PBS containing 3% paraformaldehyde for 15 min, blocked and permeabilized with 10% FBS and 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 h at RT. Primary antibodies were diluted in the same solution and incubated overnight at 4°C. Cells were washed and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies: Alexa-568 goat anti-mouse and Alexa-488 goat anti-rabbit (1:500 dilution; Invitrogen). Cover slips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, ATOM, Barcelona, Spain) with 1.5  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma) and visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal microscope (Barcelona, Spain). Co-localization and intensity profile experiments were analyzed using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). After intensity profile calculations, we defined a ratio (*R*) considering the signal at the plasma membrane of two cells (cell 1 and cell 2) and the signal in junctions [ $R = I_{\text{junctions}} / ((I_{\text{membrane1}} + I_{\text{membrane2}}) / 2)$ ]. Then, if the

R-value is  $>1$ , the signal will be more concentrated at junctions.

### Western blot analysis

For western blot studies, lysates were prepared by homogenization of cells in PBS containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors: 1  $\mu\text{M}$  pepstatin and leupeptin, 1 mM aprotinin and 1 mM PMSF, incubated for 1 h at 4°C and centrifugated. Proteins in supernatants were quantified using the BCA Kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and mixed with SDS loading sample buffer. Western blot analysis was performed as described (5). Membranes were incubated with primary antibodies: anti-MLC1 (1:100), anti-GlialCAM (1:100) and anti- $\beta$ -actin (1:10 000, Sigma) and secondary antibodies: HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse (1:10 000; Jackson). Quantification of western blots was performed using Multigauge (Fujifilm, Barcelona, Spain) or ImageJ.

### RNA interference

Conditions for knockdown of MLC1 in rat primary astrocytes have been described recently (9).

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* Online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Thomas J. Jentsch for advice in the intensity-profiling analysis and Alejandro Barrallo, Michael Pusch and Gergely Luckacs for critical reading of the manuscript.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

### FUNDING

This study was supported in part by SAF 2009-07014 (R.E.), PS09/02672-ERARE (R.E.), ELA Foundation 2009-017C4 project (R.E. and V.N.), 2009 SGR 719 (R.E.), SAF 2009-12606-C02-02 (V.N.), 2009 SGR01490 (V.N.), SAF2008-01462 (F.C.) and CSD2008-00005 (F.C.). R.E. and F.C. are recipients of an ICREA Academia prize. M.S. van der Knaap and G.C.S. are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (TOP grant 9120.6002), the Hersenstichting (grants 10F02(2).02, 13F05.04 and 15F07.30), ERARE grant 11-330-1024 and the Optimix Foundation for Scientific Research.

### REFERENCES

- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F. and Valk, J. (1995) Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.*, **37**, 324–334.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F. and Valk, J. (1996) Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.*, **92**, 206–212.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B. *et al.* (2001) Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 831–838.
- Ilja Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C. and Pronk, J.C. (2006) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 505–512.
- Tejjido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004) Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
- Tejjido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
- Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T.C. and Aloisi, F. (2008) Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin–glycoprotein complex. *Mol. Cell. Neurosci.*, **37**, 480–493.
- Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C. and van der Knaap, M.S. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412–419.
- Duarri, A., de Heredia, M.L., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M.C., Montolio, M., Lopez-Hernandez, T., Boor, I., Lien, C.F., Hagemann, T., Messing, A. *et al.* (2011) Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 228–238.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T.C. and Ambrosini, E. (2011) The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: new insights into MLC pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 90–103.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A. *et al.* (2003) Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology*, **61**, 534–537.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., van der Knaap, M.S. and Kohler, W. (2003) Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics*, **34**, 215–218.
- Scheper, G.C., van Berkel, C.G., Leisle, L., de Groot, K.E., Errami, A., Jentsch, T.J. and van der Knaap, M.S. (2010) Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, **14**, 255–257.
- van der Knaap, M.S., Lai, V., Kohler, W., Salih, M.A., Fonseca, M.J., Benke, T.A., Wilson, C., Jayakar, P., Aine, M.R., Dom, L. *et al.* (2010) Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Ann. Neurol.*, **67**, 834–837.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B. and Boschert, U. (2008) GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia*, **56**, 633–645.
- Lee, L.H., Moh, M.C., Zhang, T. and Shen, S. (2009) The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells. *J. Cell. Biochem.*, **107**, 1129–1138.
- Lopez-Hernandez, T., Ridder, M.C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V. *et al.* (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.
- Montagna, G., Tejjido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O. *et al.* (2006) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 292.



19. Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A. *et al.* (2008) Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3728–3739.
20. Wehr, M.C., Laage, R., Bolz, U., Fischer, T.M., Grunewald, S., Scheek, S., Bach, A., Nave, K.A. and Rossner, M.J. (2006) Monitoring regulated protein–protein interactions using split TEV. *Nat. Methods*, **3**, 985–993.
21. Estevez, R., Camps, M., Rojas, A.M., Testar, X., Deves, R., Hediger, M.A., Zorzano, A. and Palacin, M. (1998) The amino acid transport system  $\gamma$ +L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.*, **12**, 1319–1329.
22. Ferre, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B.T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M.A., Casado, V., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Lluís, C. *et al.* (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 11940–11945.
23. Moh, M.C., Zhang, C., Luo, C., Lee, L.H. and Shen, S. (2005) Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27366–27374.
24. Pascual-Castroviejo, I., van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., Garcia-Segura, J.M., Gutierrez-Molina, M. and Pascual-Pascual, S.I. (2005) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurologia*, **20**, 33–40.
25. Gaudry, J.P., Arod, C., Sauvage, C., Busso, S., Dupraz, P., Pankiewicz, R. and Antonsson, B. (2008) Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation. *Protein Expr. Purif.*, **58**, 94–102.
26. Favre-Kontula, L., Sattoune-Roche, P., Magnenat, E., Proudfoot, A.E., Boschert, U., Xenarios, I., Vilbois, F. and Antonsson, B. (2008) Detection and identification of plasma proteins that bind GlialCAM using ProteinChip arrays, SELDI-TOF MS, and nano-LC MS/MS. *Proteomics*, **8**, 378–388.
27. Chung Moh, M., Hoon Lee, L. and Shen, S. (2005) Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, **42**, 833–841.
28. Moh, M.C., Tian, Q., Zhang, T., Lee, L.H. and Shen, S. (2009) 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.
29. Xun, C., Luo, C., Wu, X., Zhang, Q., Yan, L. and Shen, S. (2010) Expression of hepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma. *Urology*, **75**, 828–834.
30. Zhang, T., Moh, M.C., Lee, L.H. and Shen, S. (2010) The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM is cleaved in the human breast carcinoma MCF7 cells. *Int. J. Oncol.*, **37**, 155–165.
31. Lanciotti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M. *et al.* (2010) MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.*, **37**, 581–595.
32. Moh, M.C., Lee, L.H., Zhang, T. and Shen, S. (2009) Interaction of the immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **378**, 755–760.
33. Wehr, M.C., Reinecke, L., Botvinnik, A. and Rossner, M.J. (2008) Analysis of transient phosphorylation-dependent protein–protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.*, **8**, 55.
34. Hoffmann, C., Gaietta, G., Zurn, A., Adams, S.R., Terrillon, S., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y. and Lohse, M.J. (2010) Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat. Protoc.*, **5**, 1666–1677.
35. Vilardaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z. and Lohse, M.J. (2008) Conformational cross-talk between  $\alpha$ 2A-adrenergic and  $\mu$ -opioid receptors controls cell signaling. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 126–131.

**Artículo aceptado en Diciembre de 2011  
en la revista NEURON**





# GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves as CIC-2 Cl<sup>-</sup> Channel Auxiliary Subunit

Elena Jeworutzki,<sup>1,11</sup> Tania López-Hernández,<sup>2</sup> Xavier Capdevila-Nortes,<sup>2</sup> Sònia Sirisi,<sup>2,5</sup> Luiza Bengtsson,<sup>4</sup> Marisol Montolio,<sup>2,6</sup> Giovanni Zifarelli,<sup>1</sup> Tanit Arnedo,<sup>2</sup> Catrin S. Müller,<sup>8</sup> Uwe Schulte,<sup>8</sup> Virginia Nunes,<sup>3,5,7</sup> Albert Martínez,<sup>9</sup> Thomas J. Jentsch,<sup>4</sup> Xavier Gasull,<sup>10</sup> Michael Pusch,<sup>1,11</sup> and Raúl Estévez<sup>2,6,11,\*</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 16149 Genoa, Italy

<sup>2</sup>Physiology section

<sup>3</sup>Genetic section

Department Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) and Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), D-13125 Berlin, Germany

<sup>5</sup>Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL

<sup>6</sup>U-750, Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII

<sup>7</sup>U-730, Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII

<sup>8</sup>Logopharm GmbH

D-79232 March-Buchheim, Germany

<sup>9</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain

<sup>10</sup>Laboratory Neurophysiology, Department Physiological Sciences I, School of Medicine, University of Barcelona-IDIBAPS, 08007, Spain

<sup>11</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [restevez@ub.edu](mailto:restevez@ub.edu)

DOI 10.1016/j.neuron.2011.12.039

## SUMMARY

Ion fluxes mediated by glial cells are required for several physiological processes such as fluid homeostasis or the maintenance of low extracellular potassium during high neuronal activity. In mice, the disruption of the Cl<sup>-</sup> channel CIC-2 causes fluid accumulation leading to myelin vacuolation. A similar vacuolation phenotype is detected in humans affected with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC), a leukodystrophy which is caused by mutations in *MLC1* or *GLIALCAM*. We here identify GlialCAM as a CIC-2 binding partner. GlialCAM and CIC-2 colocalize in Bergmann glia, in astrocyte-astrocyte junctions at astrocytic endfeet around blood vessels, and in myelinated fiber tracts. GlialCAM targets CIC-2 to cell junctions, increases CIC-2 mediated currents, and changes its functional properties. Disease-causing *GLIALCAM* mutations abolish the targeting of the channel to cell junctions. This work describes the first auxiliary subunit of CIC-2 and suggests that CIC-2 may play a role in the pathology of MLC disease.

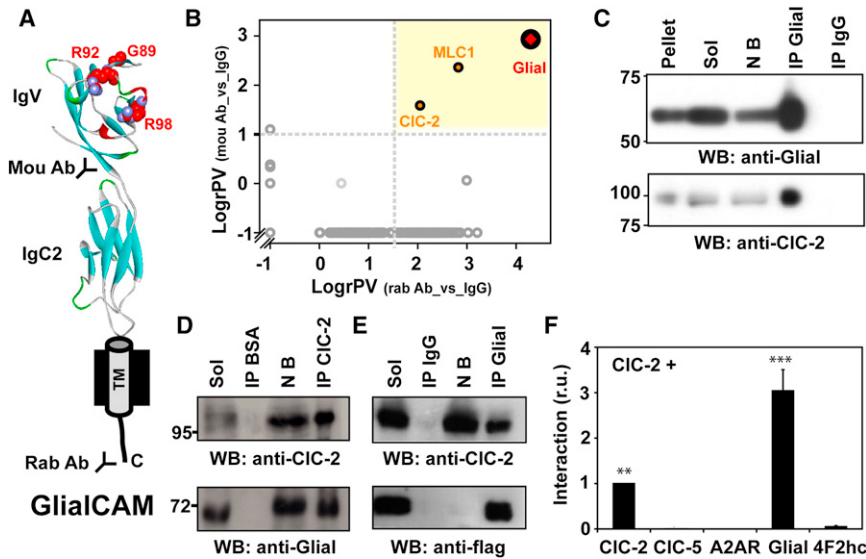
## INTRODUCTION

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy (van der Knaap et al., 1995a) characterized by macrocephaly that appears in the first years of life. MRI of patients shows swelling of the cerebral white matter and the presence of subcortical cysts, mainly in the ante-

rior temporal regions. In MLC patients, diffusion studies indicate increased water content of the brain (van der Knaap et al., 1995b). A brain biopsy from an MLC patient revealed myelin (van der Knaap et al., 1996) and astrocyte vacuolation (Duarri et al., 2011). It was suggested that MLC may be caused by impaired ion transport across cellular membranes, thereby leading to an osmotic imbalance and disturbed fluid homeostasis (Brignone et al., 2011; Duarri et al., 2011). Indeed, *MLC1*, the first disease gene discovered to underlie MLC in most patients (Leegwater et al., 2001), encodes an integral membrane protein with 8 putative transmembrane domains with low and questionable homology to ion channels (Tejido et al., 2004). Recently, *MLC1* has been proposed to be related to the activation of the volume-regulated anion channel (Ridder et al., 2011). However, the precise role of *MLC1* in volume-regulated chloride transport is not clear (Ridder et al., 2011).

Among the ion channels that are expressed in glia, the hyperpolarization-activated and osmosensitive CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel (Gründer et al., 1992; Thiemann et al., 1992) has been proposed to be an important player in extracellular ion homeostasis (Blanz et al., 2007; Fava et al., 2001; Makara et al., 2003). Mice lacking CIC-2 (*Clcn2*<sup>-/-</sup> mice) exhibit vacuolation of the white matter that resembles the pathology of MLC patients (Blanz et al., 2007). *MLC1* mutations account for only 75% of patients with MLC, but none of the patients without mutations in *MLC1* carried bona fide disease-causing mutations in *CLCN2* (Blanz et al., 2007; Scheper et al., 2010). Tests for a crosstalk between CIC-2 and *MLC1* also gave negative results. The proteins could not be coprecipitated, and reduction of *MLC1* levels by RNA interference did not change CIC-2 protein levels (Duarri et al., 2011). Hence, no role of CIC-2 in human MLC could be established.

*GLIALCAM* was recently identified as a second MLC gene (López-Hernández et al., 2011a). GlialCAM is an Ig-like cell-adhesion molecule of poorly characterized function (Favre-Kontula



**Figure 1. Identification of CIC-2 as a GlialCAM-Interacting Protein**

(A) Scheme of the GlialCAM molecule. Mutated residues studied in this work are depicted. Antibodies used for purification (mou: mouse; rab: rabbit) are shown.

(B) Evaluation of GlialCAM affinity purification from mouse brain. The scheme shows a 2D plot of relative protein enrichment in affinity purifications versus IgG controls. Proteins specifically copurified are shown in the yellow area; dashed lines indicate the specificity thresholds as suggested by the distribution of all protein ratios (gray circles).

(C), Immunoblot analysis of a sample of the affinity purification with the anti-GlialCAM rabbit polyclonal antibody stained with the same antibody (upper) and with anti-CIC-2 C1 antibody (lower); lanes resolve aliquots of pellet after solubilization, solubilizate (Sol), not bound (NB), or eluates from the purification (IP Glial). IP IgG: eluate from an IgG control.

(D) Copurification of GlialCAM with anti-CIC-2 C2 antibody. Lanes were labeled as before.

(E) Coimmunoprecipitation from HeLa cells transiently transfected with CIC-2 and Flag-tagged GlialCAM. Lanes were labeled as before.

(F) Quantification of interaction using the split-TEV assay. CIC-2 was tested for interaction with the proteins indicated below the graph. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 versus 4F2hc.

See also Figure S1.

et al., 2008). A role of GlialCAM in MLC was first suggested by biochemical assays that demonstrated that both proteins bind each other and colocalize in astrocyte-astrocyte junctions at astrocytic endfeet (López-Hernández et al., 2011a). GlialCAM targets MLC1 to cell-cell junctions (López-Hernández et al., 2011b) and *GLIALCAM* mutations identified in MLC patients impair the correct trafficking of GlialCAM and MLC1 to astrocyte-astrocyte junctions (López-Hernández et al., 2011a, 2011b).

Unlike MLC1, GlialCAM is also detected in myelin (López-Hernández et al., 2011a), mainly in oligodendroglial extensions (Favre-Kontula et al., 2008). In the present work, we show that GlialCAM interacts with CIC-2 in several glial cell types including oligodendrocytes, targeting it to cell junctions and dramatically increasing its conductance. We thus identified GlialCAM as an auxiliary subunit of CIC-2, potentially implicating the channel in the pathogenesis of MLC.

## RESULTS

### Identification of CIC-2 as GlialCAM Binding Partner

We used two different antibodies directed against GlialCAM (Figure 1A) to identify proteins from solubilized mouse brain membranes that copurify with GlialCAM. In addition to peptides from GlialCAM and MLC1, quantitative mass spectroscopy identified peptides corresponding to the CIC-2 chloride channel (Figure 1B and see Figure S1 available online) as the only other consistently and specifically copurified protein in the eluate. Western blot analysis confirmed that CIC-2 was copurified with at least a fraction of GlialCAM (Figure 1C), which may result from a partial dissociation of the complex or may indicate that not all GlialCAM is associated with CIC-2. Coimmunoprecipitation experiments using an antibody against CIC-2 confirmed the interaction between GlialCAM and CIC-2 (Figure 1D). Similar

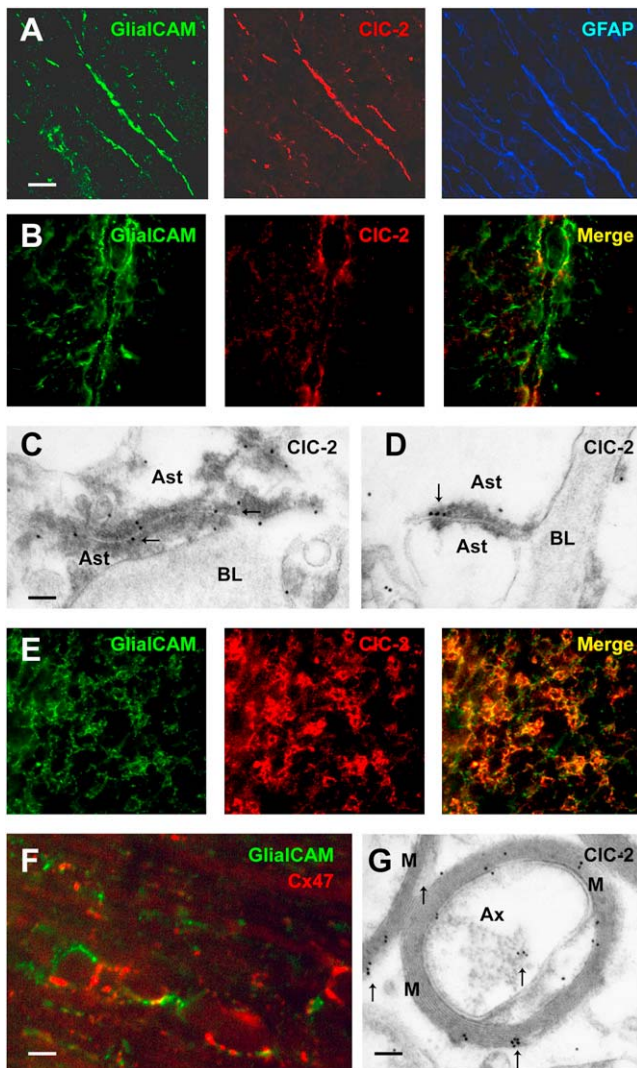
experiments using extracts from cells transfected with CIC-2 and C terminally tagged GlialCAM (Figure 1E), as well as split-TEV interaction experiments (Figure 1F), suggested that CIC-2 and GlialCAM directly interact. The interaction appeared specific since no association was observed between CIC-2 and the related 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CIC-5, the unrelated polytopic adenosine 2A receptor (A2AR), or the unrelated single transmembrane span protein 4F2hc (Figure 1F).

### Colocalization of CIC-2 and GlialCAM in Tissue

For the interaction of GlialCAM and CIC-2 to be physiologically relevant, both proteins must colocalize in native tissue. GlialCAM is found exclusively in brain, where it localizes to astrocyte-astrocyte junctions at endfeet, Bergmann glia, some pyramidal neurons and to myelin (López-Hernández et al., 2011a). In addition to neurons, CIC-2 is expressed on astrocytes and oligodendrocytes and was found in myelin-enriched fractions (Blanz et al., 2007; Fava et al., 2001; Földy et al., 2010; Makara et al., 2003; Rinke et al., 2010; Sík et al., 2000). GlialCAM colocalized in mouse brain with CIC-2 in cerebellar Bergmann glia which was counterstained for GFAP (Figure 2A). Both proteins were present at astrocytic endfeet surrounding blood vessels (Figure 2B; Blanz et al., 2007; López-Hernández et al., 2011a; Sík et al., 2000) in the cortex and in the cerebellum. In human cerebellum, immunogold electron microscopy detected CIC-2 at astrocyte-astrocyte contacts in the endfeet (Figures 2C and 2D), a location where also GlialCAM and MLC1 are present (López-Hernández et al., 2011a). GlialCAM and CIC-2 were also found to colocalize in myelinated fiber tracts along the circumference of oligodendrocytic cell bodies in mouse cerebellum (Figure 2E), where GlialCAM, CIC-2, and the oligodendrocyte-expressed gap junction protein Cx47 were present in the same cell membrane (Figure 2F; Blanz et al., 2007). In vitro cell culture

Neuron

A Subunit of CIC-2 Defective in a Leukodystrophy



**Figure 2. Localization of CIC-2 and GlialCAM in the Brain**

Mouse brain sections labeled with antibodies against GlialCAM, CIC-2, or GFAP antibodies. (A) cerebellar Bergmann glia; (B) astrocytic endfeet surrounding blood vessels in cortex; (C and D) EM immunolabeling of human cerebellum shows localization of CIC-2 (arrows) in astrocyte-astrocyte junctions near basal lamina; (E) oligodendrocytic cell bodies in myelinated fibers of cerebellar white matter tracts.

(F) Coexpression of GlialCAM and the oligodendrocyte marker Cx47 in membranes of oligodendrocytic bodies in the cerebellum.

(G) EM immunolabeling detects CIC-2 in myelin (arrows).

Scale bars for (A), (B), and (E) 20  $\mu$ m; (F) 5  $\mu$ m; for panels (C) and (D) 200 nm; (G) 500 nm. M: myelin; Ax: axon; Ast: astrocyte; BL: basal lamina. CIC-2 antibodies used: C1 (A); C2 (B–F). See also Figure S2.

studies have shown that GlialCAM is expressed in different stages of oligodendrocytic differentiation, including the bipotential O2-A progenitor NG2 positive cells (OPC cells) (Favre-Kontula et al., 2008). Immunogold EM confirmed the presence of CIC-2 in human myelin (Figure 2G).

Localization and expression of GlialCAM is independent of MLC1 (López-Hernández et al., 2011b). We similarly asked

whether the expression of GlialCAM or MLC1 depends on CIC-2. Western blots revealed that the total amount of GlialCAM and MLC1 proteins were unchanged in the brain of *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2A). Likewise, there was no change in the subcellular localization of GlialCAM and MLC1 in Bergmann glia, nor in the astrocytic endfeet around blood vessels in *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice (Figures S2B and S2C).

**GlialCAM Changes the Subcellular Distribution of CIC-2**

We then studied whether GlialCAM changes the abundance or localization of CIC-2 in heterologous expression systems. We could not detect that GlialCAM change CIC-2 protein levels (data not shown) and CIC-2 surface expression after transfection of HeLa cells or transduction of primary astrocytes, as ascertained in a chemiluminescence assay (Figure S3).

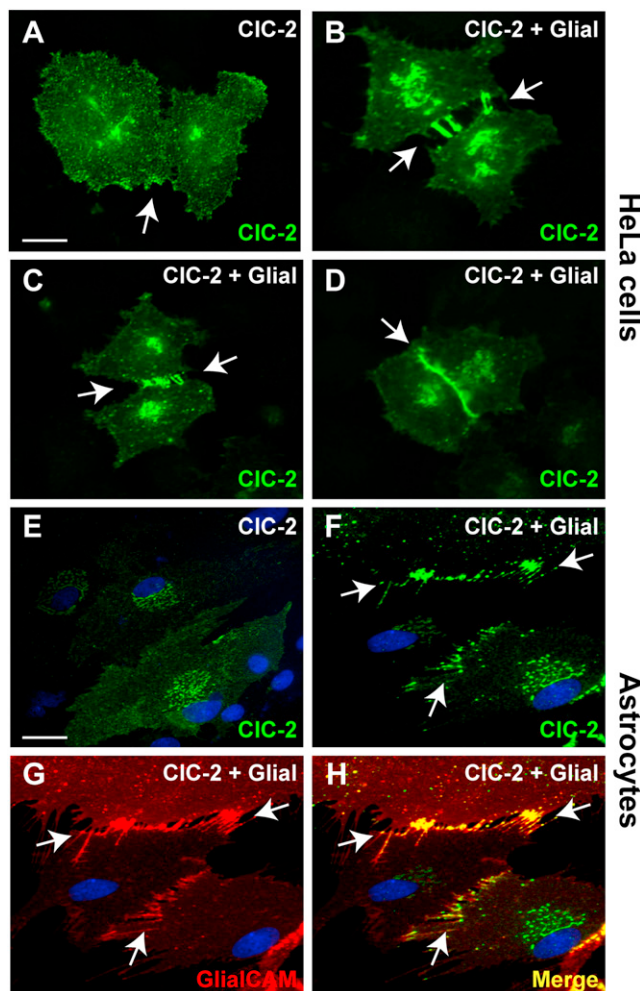
Since GlialCAM has been described to target MLC1 to cell-cell junctions (López-Hernández et al., 2011b), we assayed if GlialCAM could also modify CIC-2 localization in the same manner. In HeLa cells, CIC-2 transfected alone was detected at the plasma membrane and intracellularly (Figure 3A). Coexpression with GlialCAM directed the CIC-2 channel to cell-cell contacts (Figures 3B–3D), where both proteins colocalized (data not shown). Localization of CIC-2 together with GlialCAM was observed in long (Figure 3B) or short (Figure 3C) cell-cell contact processes and in extensive contact areas between opposite cells (Figure 3D). Such a clustering was never observed in contacting cells expressing only CIC-2 (Figure 3A). Similar results were observed in HEK293 cells (data not shown). We performed analogous experiments in primary cultures of astrocytes, where both proteins are endogenously expressed. In these cultures, adenoviral-mediated expression of CIC-2 with or without GlialCAM showed that the latter protein was necessary to target CIC-2 to astrocyte-astrocyte processes (compare Figures 3E and 3F). In these junctions, CIC-2 and GlialCAM displayed colocalization (Figures 3F–3H).

**GlialCAM Modifies CIC-2 Currents**

We next asked whether GlialCAM could modify CIC-2 function. Coexpression of GlialCAM and CIC-2 in *Xenopus* oocytes dramatically increased CIC-2-mediated currents and changed their characteristics (Figure 4A). Initial currents measured at +60 mV were more than 15-fold larger in cells coexpressing CIC-2 and GlialCAM compared to CIC-2 alone. Whereas CIC-2 currents are strongly inwardly rectifying and activate slowly upon hyperpolarization, CIC-2/GlialCAM currents were almost ohmic and displayed time-independent, instantaneously active currents (Figure 4B). Of note, the apparent inactivation observed sometimes at very negative voltages is an artifact caused by chloride depletion inside the oocytes.

Similar effects of GlialCAM on CIC-2 currents were seen in transfected HEK293 cells, although a residual time-dependent component was present (Figure 4C). Importantly, GlialCAM alone does not induce any significant current in HEK cells or *Xenopus* oocytes (Figure S4). Similarly, in transfected cells, CIC-2 steady state currents at +60 mV were dramatically increased by GlialCAM (Figure 4D). Specificity of the currents was demonstrated by the characteristic block by extracellular





**Figure 3. GlialCAM Changes the Subcellular Distribution of CIC-2 in HeLa Cells and in Primary Cultures of Astrocytes**

(A–D) GlialCAM changed the subcellular distribution of CIC-2 in transiently transfected HeLa cells from being at the plasma membrane when transfected alone (A) versus being at long cell-cell contact processes (B), at short cell-cell contact processes (C), or in extensive contact regions (D) when cotransfected with GlialCAM (arrows label cell-cell contacts). Scale bar: 10  $\mu$ m.

(E–H) Astrocytes were transduced with adenoviruses expressing CIC-2 alone or together with C terminally tagged GlialCAM at MOI 3. GlialCAM similarly brought CIC-2 to cell-cell contacts. Arrows point to astrocyte-astrocyte contacts. Immunofluorescence used a flag monoclonal antibody detecting GlialCAM protein (red) or a rabbit polyclonal antibody (C1) detecting CIC-2 (green). Colocalization between the red and the green fluorescence results in a yellow coloring (Merge). Nuclei of astrocytes were stained using DAPI (blue). Scale bar: 20  $\mu$ m.

See also Figure S3.

iodide (Gründer et al., 1992; Thiemann et al., 1992; Figure 4B) and cadmium (Clark et al., 1998) (data not shown).

To test if GlialCAM may alter native CIC-2 currents we performed whole-cell patch-clamp experiments in differentiated rat astrocytes. These cells exhibit typical hyperpolarization-activated CIC-2-like currents that were blocked by iodide (Ferroni et al., 1997; Makara et al., 2003; Figure 4E). After GlialCAM over-

expression, currents were increased and showed a large instantaneous component and less rectification (Figure 4F), qualitatively similar to the effect on CIC-2 in the heterologous systems. These currents were also blocked by iodide to similar degree (Figure 4E).

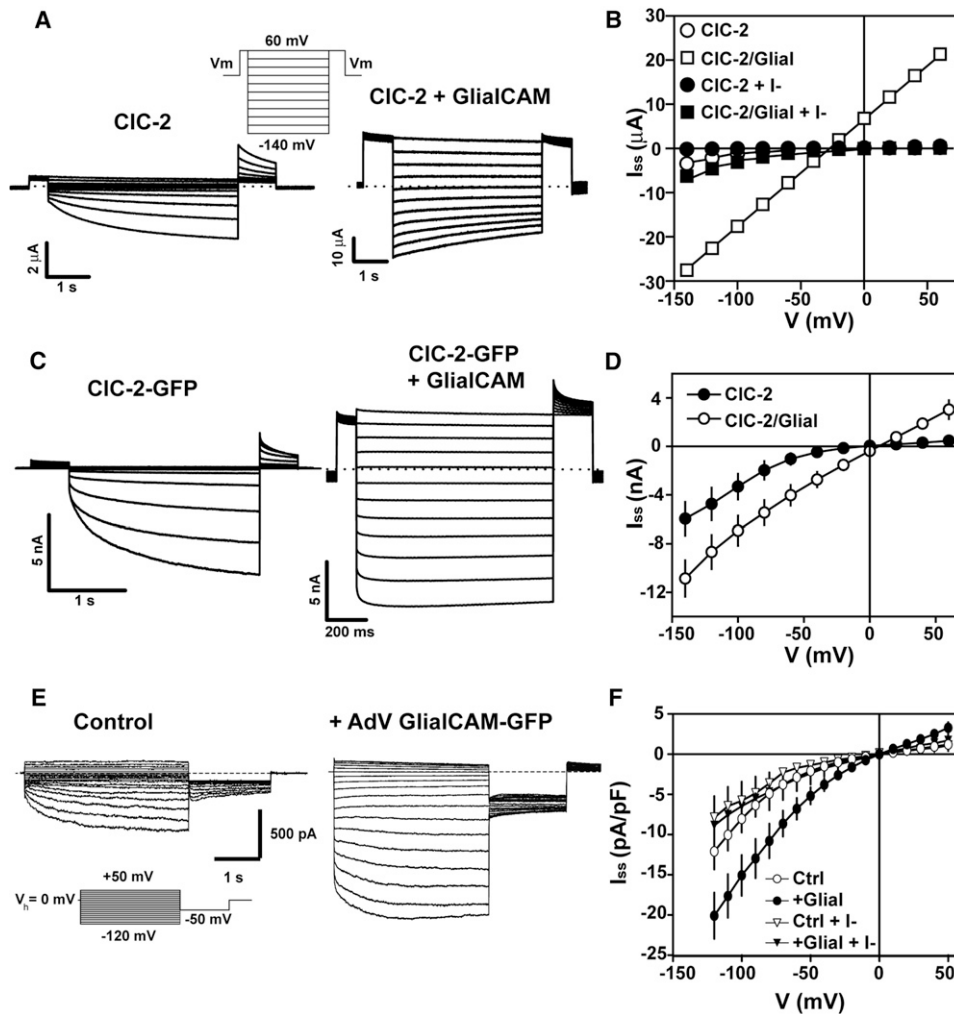
Even if GlialCAM and connexins do not overlap significantly (Figures 2F and S4D), it may be hypothesized that GlialCAM expression increases ionic currents by stimulating currents through gap junction proteins. However, overexpression of GlialCAM did not modify expression and localization of connexin 43, the major connexin of astrocytes (Figures S4C and S4E). Furthermore, blocking gap junctions with glycyrrhetic acid did not influence GlialCAM-induced currents in coupled astrocytes (Figure S4F), which were, however, blocked by iodide which is known to block CIC-2 (Gründer et al., 1992; Thiemann et al., 1992; Figure 4B).

We next addressed whether the effect of GlialCAM was specific to CIC-2. GlialCAM did not change currents of CIC-5 at positive or negative voltages (Figure 5A). We studied if human GlialCAM could interact with the CIC-2 ortholog from *Drosophila melanogaster* (DmCIC-2) (Flores et al., 2006), whose genome lacks a GlialCAM ortholog. GlialCAM interacted biochemically and increased currents of DmCIC-2 (Figures 5B and 5C), suggesting that GlialCAM evolved to interact with the channel at an interface that is evolutionary conserved among CIC-2 like channels. Additionally, we addressed interaction with the closest homolog of GlialCAM named HepaCAM2. No biochemical and functional interaction was observed between HepaCAM2 and CIC-2 (Figures 5D and 5E). Finally, we asked whether wild-type MLC1 or MLC1 containing MLC-causing mutations could influence CIC-2 or CIC-2/GlialCAM induced current in *Xenopus* oocytes. We did not find any effect on CIC-2 mediated currents (Figure 5F).

### Insights into the Molecular Mechanism of CIC-2 Activation by GlialCAM

Currents of *Xenopus* oocytes expressing GlialCAM/CIC-2 resemble those of an N-terminal deletion of CIC-2 ( $\Delta$ N), in which the osmosensitivity and the voltage-dependence is drastically altered (Gründer et al., 1992). This might suggest that GlialCAM activates CIC-2 by interacting with its N terminus. However, we found that GlialCAM still interacted biochemically with (Figure S5A) and targeted the  $\Delta$ N mutant to cell-cell contacts (Figure S5B) just like wild-type CIC-2. Moreover, GlialCAM potentiated  $\Delta$ N currents in transfected HEK293 cells (Figure S5C).

We then compared the functional properties of CIC-2,  $\Delta$ N and GlialCAM/CIC-2. Hypo-osmolarity increased currents of GlialCAM/CIC-2 and CIC-2, but had no effect on  $\Delta$ N (Gründer et al., 1992; Figure 6A). All of them have the same anion permeability sequence (Figure 6B), strongly suggesting that GlialCAM has no effect on the open-pore properties of the channel. We also addressed whether GlialCAM could increase the single channel conductance of the channel by performing nonstationary noise analysis of currents induced by CIC-2 or by CIC-2/GlialCAM at  $-100$  mV in transfected HEK cells. The conductance of CIC-2 was estimated at  $2.9 \pm 0.4$  pS ( $n = 8$ ), a value very similar to what has been previously reported (Weinreich and Jentsch,



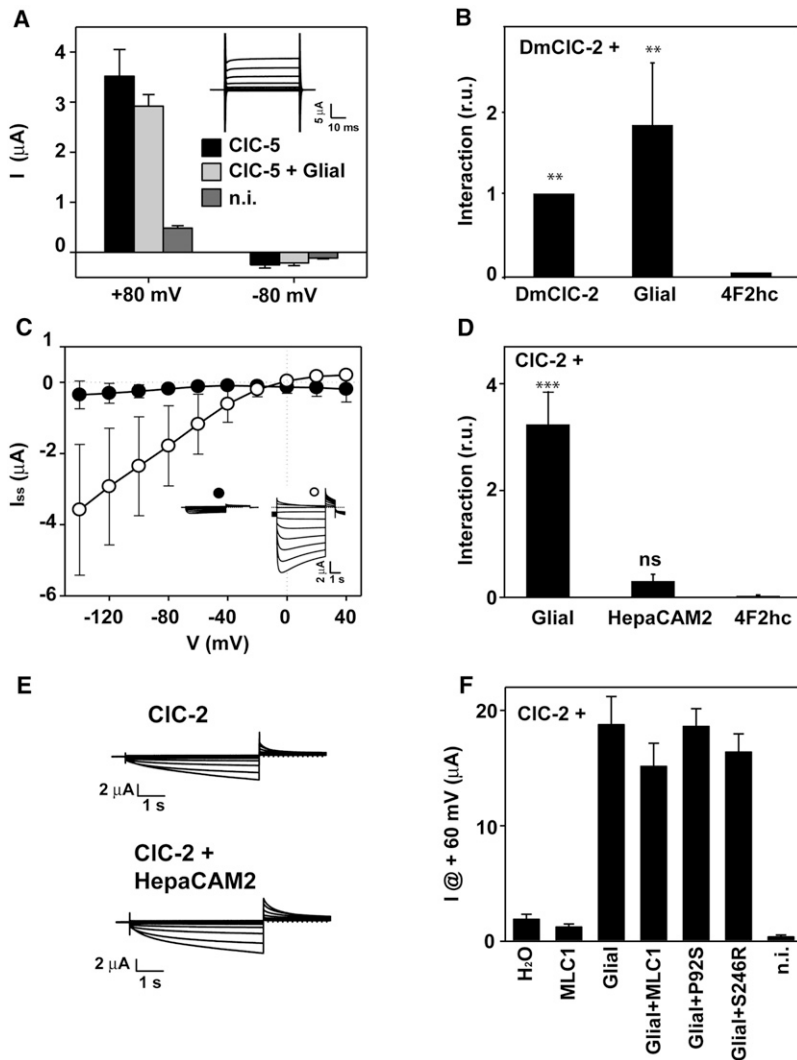
**Figure 4. GlialCAM Modifies CIC-2 Currents in *Xenopus* Oocytes, HEK Cells, and Primary Rat Astrocytes**

(A) Currents mediated by CIC-2 (left) expressed in oocytes and after coexpression of CIC-2 with GlialCAM (right).  
 (B) Representative steady-state current-voltage relationship of CIC-2 (circles) and CIC-2 coexpressed with GlialCAM (squares) in chloride (open symbols) or iodide (filled symbols). Average initial currents measured at +60 mV were  $0.96 \pm 0.17 \mu\text{A}$  ( $n = 14$ ) for CIC-2 and  $17.2 \pm 2.2 \mu\text{A}$  ( $n = 10$ ) for CIC-2/GlialCAM.  
 (C) Typical whole-cell currents from transfected HEK293 cells with CIC-2-GFP alone (left) or together with GlialCAM (right). The GFP tag does not affect CIC-2 current properties.  
 (D) Average steady-state current voltage from CIC-2-GFP (filled circles) or CIC-2-GFP/GlialCAM (circles) transfected HEK293 cells.  
 (E) Left: representative trace of whole-cell inwardly rectifying chloride currents in dbcAMP-treated cultured neocortical rat astrocytes. These currents, as described (Ferroni et al., 1997), were blocked when chloride was replaced by iodide (F) and were not blocked by tamoxifen (data not shown). Right: representative trace of chloride currents of dbcAMP-treated astrocytes transduced with adenoviruses expressing GlialCAM fused to GFP. The inset shows the voltage protocol used.  
 (F) Average steady-state current-voltage relationship of dbcAMP-treated astrocytes (circles,  $n = 14$ ) or transduced with adenoviruses expressing GlialCAM-GFP (filled circles,  $n = 14$ ) in chloride medium. Recordings were performed in symmetrical chloride concentrations. In some recordings chloride was exchanged by iodide (triangles or filled triangles). At hyperpolarizing voltages iodide block was by  $32.7\% \pm 3.2\%$  for control astrocytes ( $n = 6$ ) and by  $56.8\% \pm 2.9\%$  for astrocytes transduced with adenoviruses expressing GlialCAM-GFP ( $n = 8$ ).  
 See also Figure S4.

2001). For CIC-2/GlialCAM we obtained a value of  $2.6 \pm 0.2 \text{ pS}$  ( $n = 8$ ), not statistically significantly different from the value for CIC-2 alone ( $p > 0.5$ ). We conclude that GlialCAM does not modify single-channel properties of CIC-2. Interestingly, GlialCAM similarly diminished the inhibition by acidic pH of both CIC-2 and  $\Delta\text{N}$  (Figure 6C). This result suggested that GlialCAM may activate CIC-2 by opening the common gate

that acts on both pores of the homodimeric channel, as this gate is sensitive to acidic pH (Niemeyer et al., 2009).

GlialCAM displays a long cytoplasmatic C terminus comprising about 30% of the protein (Favre-Kontula et al., 2008). However, consistent with its poor sequence conservation between species, the deletion of the entire C terminus did not abolish the interaction with CIC-2, its targeting to cell junctions, and the



**Figure 5. Specificity of the CIC-2 GlialCAM Interaction**

(A) Human CIC-5 was expressed in oocytes with and without GlialCAM. Currents were quantified at positive (+80 mV) and negative (−80 mV) voltages 3 days after injection. The inset shows representative CIC-5 + GlialCAM traces using a voltage-clamp protocol with pulses ranging from +120 mV to −120 mV in 20 mV steps.

(B) Interaction between DmCIC-2 and DmCIC-2 or GlialCAM was monitored using split-TEV assays. 4F2hc was used as a negative control. The result is an average of 5 independent experiments. \*\*p < 0.01 versus 4F2hc.

(C) DmCIC-2 was expressed in *Xenopus* oocytes by itself or together with GlialCAM. Two days after injection in oocytes DmCIC-2 ± GlialCAM currents were determined. Steady state currents are plotted against voltage (n = 5 ± SEM). The inset shows representative current traces of DmCIC-2 (filled circle) and DmCIC-2 / GlialCAM (open circle).

(D) Interaction between CIC-2 and GlialCAM or HepaCAM2 by split-TEV assays. 4F2hc was used as a negative control. The result is an average of 13 independent experiments. \*\*\*p < 0.001; “ns” indicates no significant difference versus 4F2hc.

(E) Typical CIC-2 currents in *Xenopus* oocytes expressed by itself (left) or coexpressed with HepaCAM2 (right). HepaCAM2 positive protein expression was assessed by Western blot (data not shown).

(F) Currents measured in *Xenopus* oocytes at +60 mV after the expression of CIC-2 alone (3 ng), CIC-2 (3 ng) + GlialCAM (5 ng), or CIC-2 (3 ng) + GlialCAM (5 ng) + wild-type MLC1 (3 ng) or containing the MLC-causing mutations P92S and S246R (3 ng). The result is a representative experiment of two experiments with at least 5 oocytes measured for each condition.

activation of CIC-2 currents in transfected cells (Figures S5D–S5F). Hence the interaction between both proteins may depend on the transmembrane and/or the N-terminal part of GlialCAM. Deletion of the N-terminal part of GlialCAM, while keeping the cleavable signal peptide, resulted in a lack of surface expression (data not shown), precluding proper biochemical studies.

### Impact of MLC-Related Mutations Identified in GLIALCAM on CIC-2

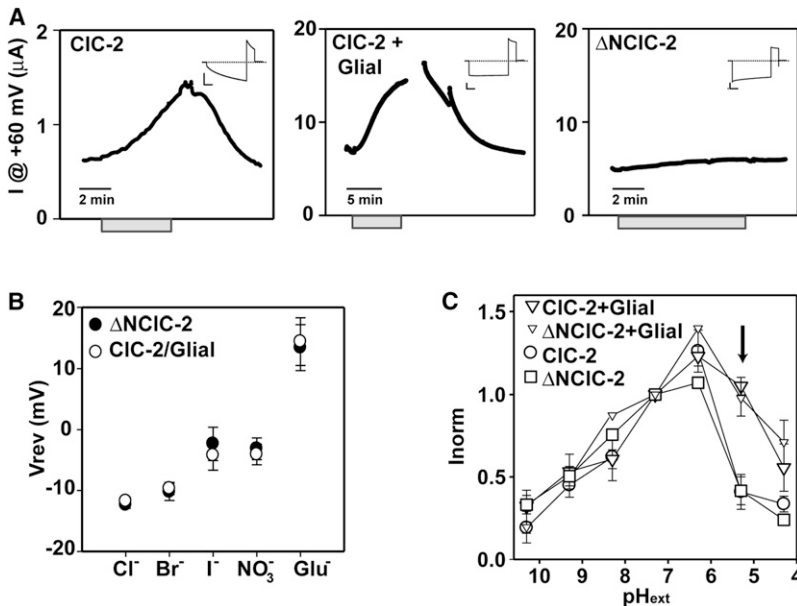
Several *GLIALCAM* mutations found in patients with MLC truncate the protein before the transmembrane domain or result in amino-acid changes in the N-terminal, extracellular part of GlialCAM (López-Hernández et al., 2011a). We studied four of these missense mutations located within the IgV domain (Figure 1A). All GlialCAM proteins containing MLC-causing missense mutations retained their physical interaction with CIC-2 (Figures 7A and S6A) and increased CIC-2 activity similar to wild-type GlialCAM in *Xenopus* oocytes (Figures 7B and S6B) and in transfected cells (data not shown). In contrast, all of them abolished

the targeting of CIC-2 to cell junctions in HeLa or HEK293 cells (Figures 7C and 7D).

We also analyzed the effect of the MLC-causing mutations in GlialCAM on the localization of CIC-2 in primary cultures of rat astrocytes through adenoviral-mediated transduction (Figure 8). Coexpression of CIC-2 with GlialCAM mutant variants resulted in intracellular and cell membrane staining of CIC-2 (Figures 8B–8E), but not the typical wild-type GlialCAM induced localization in cell junctions (Figure 8A).

### DISCUSSION

In this work, we have identified GlialCAM as an interaction partner of the CIC-2 chloride channel. As CIC-2 is functional in the absence of GlialCAM, albeit displays different biophysical properties, and since GlialCAM shows a much more restricted expression pattern than CIC-2 (Thiemann et al., 1992), it is clear that GlialCAM is not an obligate β-subunit of CIC-2, but an auxiliary subunit that associates with CIC-2 only in some cell types. MLC1 wild-type or containing MLC-causing mutations, by contrast, does not modify CIC-2 currents neither in the presence nor in the absence of GlialCAM, and biochemical studies indicate that CIC-2 and MLC1 do not interact directly (Duarri



**Figure 6. Electrophysiological Characterization of the GlialCAM/CIC-2 Complex**

(A) Dependence on the extracellular osmolarity of CIC-2, CIC-2 + GlialCAM, or  $\Delta$ NCIC-2 currents. Gray bars indicate application of the hypotonic solution. Insets show typical responses of the same oocytes to a pulse to -140 mV before swelling.

(B) Reversal potential of  $\Delta$ NCIC-2 ( $n = 5 \pm$  SEM) and CIC-2/GlialCAM ( $n = 5 \pm$  SEM) currents under different anionic conditions.

(C) pH dependence of CIC-2 and  $\Delta$ NCIC-2, each without and with GlialCAM. Currents were normalized to the value at pH 7.3. Arrow points to the pH value with the largest difference between the groups that express or not GlialCAM.

See also Figure S5.

et al., 2011). Furthermore, MLC1 expression and localization is unaltered in *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice. These data suggest that GlialCAM/MLC1 and GlialCAM/CIC-2 may form distinct complexes. Recently, the lack of MLC1 has been correlated with a variable impairment in cell volume regulation that may be mediated by the volume regulated anion channel (VRAC) (Ridder et al., 2011). However, VRAC is distinct from CIC-2 as evident from very different biophysical characteristics (Jordt and Jentsch, 1997). Furthermore, the mechanism of modulation of VRAC by MLC1 is unclear. As MLC1 and CIC-2 share GlialCAM as a subunit, we cannot exclude that MLC1 could regulate CIC-2 function in an indirect/unknown manner. Therefore, an interesting hypothesis that should be tested in the next future is whether CIC-2 function is altered in cells lacking MLC1.

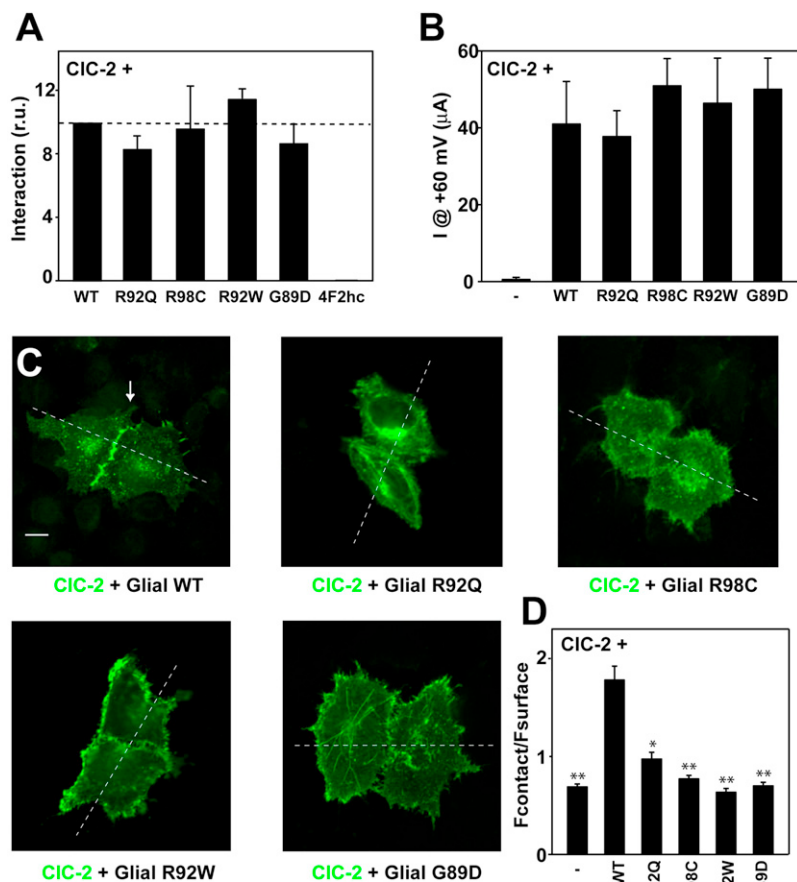
GlialCAM by itself localizes to cell-cell junctions (López-Hernández et al., 2011b), probably being retained there by homophilic or heterophilic interactions with membrane proteins of the apposing cell. In other GlialCAM homolog proteins such as the members of the SLAM family (Engel et al., 2003), localization at the immunological synapse of SLAM proteins is achieved by trans-homophilic interactions between the IgV domains of opposite molecules. Furthermore, GlialCAM is also able to localize CIC-2 and MLC1 (López-Hernández et al., 2011b) to cell-cell junctions in heterologous expression systems and in primary cultures of astrocytes. The role of GlialCAM as a CIC-2 subunit appears to be specific within its protein family, as its closest homolog, HepaCAM2, did not interact with CIC-2. GlialCAM carrying MLC-related mutations (López-Hernández et al., 2011a) fail to arrive at cell-cell junctions (López-Hernández et al., 2011b). As a consequence, also their associated subunits, MLC1 and CIC-2, are not properly targeted to cell-cell junctions. Thus, GlialCAM function may be needed to cluster CIC-2 and MLC1 in particular to astrocyte-astrocyte junctions at astrocytic endfeet. Here, the CIC-2 chloride channel may be needed to support a transcellular chloride flux or to compensate large elec-

trochemical ion gradients that may occur at these junctions during ion-driven changes in osmolarity. However, the chloride flux mediated by CIC-2/GlialCAM in cell junctions most likely fulfills a different role compared to the one mediated by gap junctions as these proteins do not colocalize completely. Our experiments also exclude that GlialCAM activates astrocyte gap junctions, since their blockade did not influence currents induced by GlialCAM overexpression, and GlialCAM overexpression had no influence on connexin 43 protein levels or its subcellular localization.

Recent reports indicated that the CIC-2 channel in neurons constitutes a part of the background conductance regulating input resistance and providing an efflux pathway for chloride (Földy et al., 2010; Rinke et al., 2010), which may be a safeguard mechanism to prevent chloride accumulation in active GABAergic synapses. In contrast, the role of CIC-2 in glial cells is unknown. Recordings from mouse slices demonstrated that CIC-2-mediated current was reduced in reactive astrocytes within a lesion (Makara et al., 2003). Strong evidence in favor of an important physiological role of CIC-2 in glial cells is provided by the phenotype of *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice, which display an MLC-like vacuolization in the brain (Blanz et al., 2007). Vacuolization in the brain has been also observed in mice disrupted for the potassium channel Kir4.1 (Neusch et al., 2001) or double-disrupted for connexins 32 and 47 (Menichella et al., 2006). These proteins are thought to be crucial for potassium siphoning by glial cells, a process that is needed to avoid neuronal depolarization by extracellular K<sup>+</sup> during repetitive action potential firing (Rash, 2010). In agreement with this role in ion siphoning, in Kir4.1 knockout mice there was no vacuolation in the optic nerve after blocking action potential generation with tetrodotoxin (Neusch et al., 2001). It was neither observed in the *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice possibly because they are blind due to retinal degeneration (Blanz et al., 2007). Hence degeneration in both mouse models depend on nerve activity, in accord with the siphoning process that is required after neuronal repolarization. It has been suggested that CIC-2 may play a role in charge compensation during potassium influx or efflux in glial cells (Blanz et al., 2007).

CIC-2-mediated currents were increased upon GlialCAM expression and showed less inward rectification. However,





**Figure 7. Biochemical and Functional Consequences of *GLIALCAM* Mutations on CIC-2**

(A) Interaction between CIC-2 and GlialCAM or GlialCAM containing MLC-related mutations revealed by split-TEV interaction assays (n = 5).

(B) Average instantaneous currents at +60 mV from CIC-2 expressing oocytes coinjected with saturating concentrations of GlialCAM or the indicated GlialCAM variants. The result is an average of n = 5 in each experiment from three independent experiments.

(C) Immunofluorescence of HeLa cells expressing CIC-2 plus wild-type GlialCAM or GlialCAM containing the MLC-related mutations R92Q, R98C, R92W, and G89D. Scale bar: 10  $\mu$ m. Expression at contact sites and non-contact surface membrane was determined by the analysis of the intensity profile along the dashed line.

(D) Relative fluorescence intensity at cell contacts. Intensity profile analysis revealed that CIC-2 alone had a ratio R of fluorescence  $F_{\text{contact}}/F_{\text{surface}}$  (see [Experimental Procedures](#)) of  $0.7 \pm 0.03$  (n = 58), CIC-2 + GlialCAM a value of  $1.8 \pm 0.14$  (n = 55), and the GlialCAM variants studied (with at least 24 pair of cells analyzed) had R values less than 1 (see [Experimental Procedures](#)), indicating that the variants containing MLC-related mutations were not able to cluster CIC-2 to cell junctions. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 versus wild-type GlialCAM plus CIC-2. Similar results were observed in HEK cells (not shown). See also [Figure S6](#).

CIC-2 activity recorded in cultured astrocytes (Ferroni et al., 1997) or in astrocytes in brain slices (Makara et al., 2003) resembles that of CIC-2 alone. This may be due to different recording conditions, or, alternatively, it may be that GlialCAM interacts with CIC-2 only under special circumstances, such as those occurring during high neuronal activity.

A polarized distribution of the Kir4.1 channel in astrocyte membranes in contact with endothelial cells, mediated by interaction with proteins of the DGC (dystrophin-glycoprotein complex) (Nagelhus et al., 2004), is required for potassium siphoning. In an analogous way, the polarized localization of CIC-2 mediated by GlialCAM in astrocyte-astrocyte or oligodendrocyte-astrocyte contacts may be also needed to support a directional flux of potassium from neurons to blood vessels. As a cell-adhesion molecule, GlialCAM could influence the expression of other molecules expressed in cell junctions such as connexins. Similar to DGC proteins, the localization in cell-cell contacts of GlialCAM itself and of associated molecules may be achieved by transmediated interactions or by interactions with intracellular scaffolds in each cell. It may be possible that GlialCAM could be involved in organizing a more extensive cluster of proteins at the astrocytic junctions in the endfeet.

We propose that the lack of the stimulatory effect of GlialCAM on CIC-2 currents, or a mislocalization of this Cl<sup>-</sup> channel, or

both, will impair glial chloride transport. This may impair not only chloride homeostasis, but also potassium siphoning and cell volume regulation that is particularly important during neuronal activity. This in turn may entail accu-

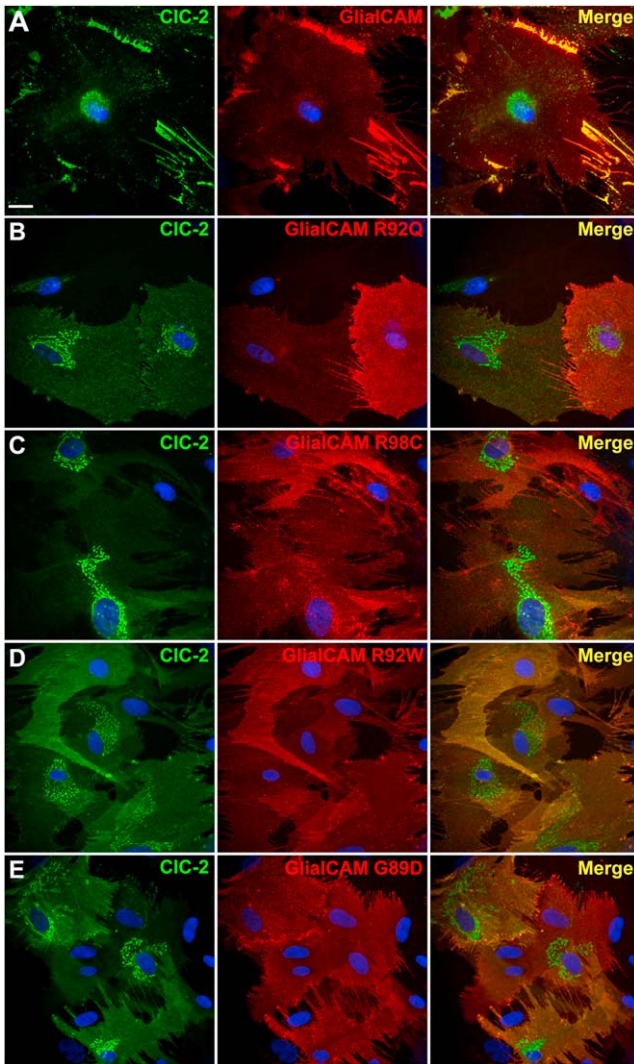
mulation of osmotically driven water, lead to the vacuolization observed in MLC patients with mutations in *GLIALCAM* or in *Cln2*<sup>-/-</sup> mice. Vacuolization observed in MLC patients with *GLIALCAM* mutations could also be due to defects in GlialCAM by itself, or to a mislocalization of MLC1, an established causal player in MLC. Additionally, the adhesive properties of GlialCAM, and their importance for the anatomy of the brain and the pathogenesis of MLC remain to be studied.

The fact that so far no disease-causing *CLCN2* mutation has been found in patients with MLC (Blanz et al., 2007; Schepers et al., 2010) might be explained by the presence of additional symptoms (e.g., blindness, male infertility, as expected from the phenotype of *Cln2*<sup>-/-</sup> mice [Bösl et al., 2001]) that could result in improper disease classification. The male infertility could also lead to an underrepresentation of *CLCN2* mutations in the human population. Thus, proof of the involvement of CIC-2 in MLC disease will require, for example, immunolocalization studies in brain biopsies of MLC patients with *GLIALCAM* mutations.

In summary, the discovery of GlialCAM as the first auxiliary subunit of CIC-2 increases the complexity of regulation of the CLC chloride transporter/channel family for which so far only two  $\beta$ -subunits have been described (Estévez et al., 2001; Lange et al., 2006). Our work provides new clues to uncover the physiological role of the CIC-2 channel in glial cells, and suggests that

Neuron

A Subunit of CIC-2 Defective in a Leukodystrophy



**Figure 8. CIC-2 and GlialCAM Subcellular Localization Changes Caused by *GLIALCAM* Mutations in Primary Cultures of Astrocytes** (A–E) Astrocytes were cotransduced with adenoviruses expressing CIC-2 together with wild-type GlialCAM (A) or containing the MLC-related mutations R92Q (B), R98C (C), R92W (D), and G89D (E). Cells were fixed, permeabilized, and then immunofluorescence was performed with a rabbit polyclonal antibody against CIC-2 (green) and a monoclonal antibody detecting GlialCAM protein (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Colocalization between the green and the red channel is shown in yellow. Images correspond to representative cells from three independent experiments. Scale bar: 20  $\mu$ m.

the CIC-2 channel may be involved in the physiopathology of MLC disease.

**EXPERIMENTAL PROCEDURES**

**Biochemistry**

Proteomic analysis: for solubilization, membrane vesicles (1 mg) were resuspended in ComplexioLyte buffer 47a (at 0.8 mg protein/ml, LOGOPHARM GmbH, Germany; with protease inhibitors), incubated for 30 min at 4°C and cleared by ultracentrifugation (10 min at 150,000  $\times$  g). 0.8 ml solubilizates were incubated for 2 hr at 4°C with 10  $\mu$ g of immobilized anti-rabbit GlialCAM

(López-Hernández et al., 2011a), anti-mouse GlialCAM (Vitro, Spain) and control IgG (Upstate, USA), respectively. After brief washing (2  $\times$  5 min) with ComplexioLyte 47a, bound proteins were eluted with Laemmli buffer (DTT added after elution). Eluates were shortly run on SDS-PAGE gels and silver-stained prior to tryptic digestion for MS analysis. LC-MS/MS analysis was performed as described (López-Hernández et al., 2011a). Immunoprecipitation and western blot studies of HeLa cells transiently transfected or solubilized rat brain to confirm protein-protein interactions with CIC-2 and GlialCAM antibodies was performed as described (López-Hernández et al., 2011a). Relative MS sequence coverage of CIC-2 protein (Figure S1) was calculated as  $SC = N_i / (N_i + N_{an})$ , where  $N_i$  is the number of amino acid residues of the identified peptides (with Mascot score  $\geq$  20) and  $N_{an}$  is the number of MS-accessible but not identified amino acids (peptides with mass of 740–3,000 u) of the respective Swiss-Prot sequence.

**Molecular Biology**

Rat CIC-2 and the N-terminal deletion ( $\Delta$ 16–61) mutant  $\Delta$ N (Gründer et al., 1992) constructs for expression in oocytes were in the pTLN vector (Lorenz et al., 1996). For localization studies in HEK293 or HeLa cells, rCIC-2 and  $\Delta$ N were C-terminally fused to GFP or to flag. DmCIC-2 and CIC-2 with an HA extracellular tag was provided by LP Cid (Centro de Estudios Científicos, Chile). GlialCAM- $\Delta$ C was constructed eliminating residues from 289 until the stop codon.

**Voltage-Clamp Experiments**

*Xenopus* oocytes were injected and maintained as described (Estévez et al., 2003). For CIC-2, 5 ng cRNA and for  $\Delta$ N 0.25 ng cRNA/oocyte were injected. When coexpressing, 1.25 ng cRNA of GlialCAM were coinjected with CIC-2. Oocytes were perfused with (in mM): 100 NaCl, 5 MgSO<sub>4</sub>, and 10 HEPES/NaOH (pH 7.3). To estimate the specific CIC-2-mediated chloride currents, iodide (100 mM NaI replacing the NaCl), which blocks CIC-2-mediated outward currents (Gründer et al., 1992; Thiemann et al., 1992), was applied in every experiment. Oocytes which did not exhibit a significant block were discarded. For selectivity experiments (Figure 6B), 100 mM Cl<sup>-</sup> was exchanged by 100 mM of the tested anion. For pH experiments, 10 mM buffer was used (pH 10–9: CAPS [N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid]; pH 8–7: HEPES; pH 6–5: MES; and pH 4: Glutamic acid). Hypotonicity effects were studied as described (Gründer et al., 1992). For CIC-2, an initial 1 s voltage pulse at +60 mV was applied, followed by 5 s voltage steps from –140 mV to +60 mV in 20 mV increments and a tail pulse of 1 s to 60 mV. To quantify expression levels, the initial tail current (at +60 mV) after the –140 mV test pulse was estimated by back extrapolation of a single exponential fit to the decaying tail current. To estimate the number of constitutively active channels, instantaneous currents were measured during a short test pulse to +60 mV without prior activation by hyperpolarization.

**Patch-Clamp Experiments**

Fluorescent HEK293 cells, expressing CLC-2-GFP or  $\Delta$ N-GFP with or without GlialCAM, were measured with an extracellular solution containing (in mM): 140 NaCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES/NaOH (pH 7.3) using standard patch clamp technique. Intracellular solution was (in mM) 130 NaCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 2 EGTA, and 10 HEPES/NaOH (pH 7.3). Only cells for which currents were reversibly blocked by iodide were used for analysis. Patch clamp of astrocytes was performed as described (Ferroni et al., 1997).

**Surface Expression by Chemiluminescence**

Surface expression in transfected mammalian cells or astrocytes was performed similarly as previously described (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004). Briefly, 48 hr after transfection, cells were cleaned with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde. After PBS washing, cells were blocked with 1% BSA in PBS for 30 min, and incubated with 1 ml of 3F10 anti-HA antibody at 0.2  $\mu$ g/ml in blocking solution for 1 hr at RT. Cells were washed six times with blocking solution, and incubated for 20 min with 1 ml of a 1:1,000 dilution horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (donkey anti-rat IgG, Jackson, Suffolk, UK) in blocking solution. Cells were washed four times with blocking solution and eight times with PBS. Luminescence was measured

of one dish at a time with 500  $\mu$ l of Power Signal ELISA solution (Pierce) in a Turner TD-20/20 luminometer (Turner Biosystems, Madison, WI, USA).

#### Immunological Procedures

Two immune sera against CIC-2 were generated against overlapping sequences of the C terminus. In the first antibody (C1 Ab), the peptide used for immunization was (C)HGLPREGTPSDSDDKSQ. The native protein sequence contains a cysteine residue instead of the highlighted serine in order to avoid coupling this residue to the carrier protein. In the second antibody (C2 Ab), the peptide used for immunization was (C)RSRHGLPREGTPSDSD. (C) is the cysteine that was used for coupling. Affinity purification of the antibodies was used as described (López-Hernández et al., 2011a). Mostly, the C1 antibody was used in western blot studies, and the C2 antibody was used in immunoprecipitation, immunocytochemistry, and EM immunogold. Both antibodies gave no staining in the *Cicn2*<sup>-/-</sup> mice.

#### Primary Culture and Adenoviral Transduction

Rat primary quiescent astrocyte cultures were prepared as described previously (Duarri et al., 2008). Dibutyryl-cAMP differentiated rat astrocytes were obtained as described (Ferroni et al., 1997). Adenoviruses expressing three copies of the flag epitope fused to human GlialCAM, either wild-type or containing mutations have been described (López-Hernández et al., 2011a). Adenoviruses expressing GlialCAM fused to EmGFP or CIC-2 fused to three copies of the Flag epitope or containing an extracellular HA epitope were constructed in a similar manner. Transduction of astrocytes was performed as already described (López-Hernández et al., 2011a).

#### Immunofluorescence and Electron Microscopic Studies

Tissue immunohistochemistry and immunofluorescence were performed as previously described (Blanz et al., 2007; Teijido et al., 2004). For electron microscopic studies, human cerebellum samples were processed as previously described (López-Hernández et al., 2011a).

#### Quantification of Localization in Cell Contacts

Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used to quantify fluorescence at cell contacts and in the plasma membrane at cell contact free sites by performing intensity profile experiments. We defined a ratio (R) considering the fluorescence signal at the plasma membrane of two cells (cell 1 and cell 2) and the signal in junctions.  $[R = F_{\text{junction}} / (F_{\text{membrane1}} + F_{\text{membrane2}})]$ . Thus, if the R value is > 1, the signal will be concentrated at junctions.

#### Split-TEV Method

Split-TEV (Tobacco etch virus protease) assays were performed as described (López-Hernández et al., 2011b). We used a mutant form of the TEV protease (S219V) which prevents its self-digestion but does not affect its catalytic efficiency. The oligopeptide substrate used as the TEV protease-recognition site was ENLYFQS, and the chimeric transcription factor used was GV (obtained from the pM3-VP16 vector) (Clontech, Nucliber, Madrid, Spain), which contains the yeast Gal4DNA binding domain and the herpes simplex VP16 transactivation domain. After TEV protease cleavage, GV translocates into the nucleus and induces the reporter Gaussia Luciferase gene expression (pNEBr-X1Gluc) (New England BioLabs, IZASA, Barcelona, Spain), which is secreted into the cell culture medium.

TEV protease was divided in two fragments: the TEV-N (residues 1–118) and the TEV-C (residues 119–242). We fused the TEV-N fragment, the TEV protease recognition site and the chimeric transcription factor GV to the C-terminal of CIC-2, the mutant  $\Delta$ NCIC-2, or DmCIC-2 in a pCDNA3 vector containing a CMV promoter. In addition, we fused the TEV-C fragment to the C-terminal of CIC-2, CIC-5,  $\Delta$ NCIC-2, GlialCAM wild-type, HepaCAM2, GlialCAM $\Delta$ C, GlialCAM containing the mutations R92Q, R98C, R92W, and G89D, and the adenosine 2A receptor. The fusion of the TEV-C fragment to 4F2hc was done N-terminal. All the proteins with the TEV-C fragments were cloned in a pCDNA6.2/V5-pL Dest, containing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) promoter, to provide low to moderate levels of expression.

All the expression plasmids were constructed by PCR using a polymerase with proofreading (KOD Hot Start polymerase, Calbiochem, Darmstadt,

Germany), adding the attB1, attB2, attB5R, or attB5 recombination sites compatible with the Multisite Gateway System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All protocols were performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

HeLa cells were transiently transfected with the corresponding cDNA constructs. The total DNA transfected was 2  $\mu$ g, with the following ratios: 0.75  $\mu$ g of each protein containing the TEV-N and the TEV-C fragments, 0.3  $\mu$ g of the reporter gene pNEBr-X1GLuc, and 0.2  $\mu$ g of the pCMV- $\beta$ Gal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 hr, 20  $\mu$ l were removed from the supernatant of the cells and Gaussia luciferase activity was measured in a TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems, Madison, USA), after the addition of 20  $\mu$ M of native colenterazine. To normalize the data, cells were solubilized and 30  $\mu$ l of the cell lysates were used to measure the  $\beta$ -Galactosidase enzyme activity using the Luminiscent  $\beta$ -Galactosidase Detection Kit II (Clontech) in the same luminometer.

#### Statistical Analyses

For determination of the statistical significance between groups, either the Student's t test or the Bonferroni's comparison test were used. p values are annotated in each figure. Values depicted are means  $\pm$  SEM.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.neuron.2011.12.039.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pablo Cid for the gift of DmCIC-2 and human CIC-2 with an HA extracellular tag, Muriel Auberson for the generation of the CIC-2 C1 antibody and Soledad Alcántara for the NG2 antibody. We thank Alejandro Barrallo and Manuel Palacín for comments on the manuscript. This study was supported in part by SAF 2009-07014 (R.E.), PS09/02672-ERARE to R.E., ELA Foundation 2009-017C4 project (R.E. and V.N.), 2009 SGR 719 to R.E., SAF 2009-12606-C02-02 (V.N.), 2009 SGR01490 to V.N., FIS08/0014 (X.G.), FIS PI11/01601 (X.G.), and 2009SGR (X.G.). R.E. is a recipient of an ICREA Academia prize. M.P. and E.J. are supported by the Compagnia San Paolo (Torino, Italy), Telethon Italy (GGP08064), and the Italian Institute of Technology (progetto SEED).

Accepted: December 23, 2011

Published: March 7, 2012

#### REFERENCES

- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hübner, C.A., and Jentsch, T.J. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel CIC-2. *J. Neurosci.* 27, 6581–6589.
- Bösl, M.R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A.F., and Jentsch, T.J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289–1299.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T.C., and Ambrosini, E. (2011). The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: new insights into MLC pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 20, 90–103.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J., and Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 506, 665–678.
- Duarri, A., Teijido, O., López-Hernández, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Martínez, A., 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., Ridder, M.C., Montolio, M., López-Hernández, T., Boor, I., Lien, C.F., Hagemann, T., Messing, A., et al. (2011). Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.* 43, 228–238.
- Engel, P., Eck, M.J., and Terhorst, C. (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 813–821.
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., and Jentsch, T.J. (2001). Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414, 558–561.
- Estévez, R., Schroeder, B.C., Accardi, A., Jentsch, T.J., and Pusch, M. (2003). Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1. *Neuron* 38, 47–59.
- Fava, M., Ferroni, S., and Nobile, M. (2001). Osmosensitivity of an inwardly rectifying chloride current revealed by whole-cell and perforated-patch recordings in cultured rat cortical astrocytes. *FEBS Lett.* 492, 78–83.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B., and Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* 56, 633–645.
- Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M., and Rapisarda, C. (1997). Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia* 21, 217–227.
- Flores, C.A., Niemeyer, M.I., Sepúlveda, F.V., and Cid, L.P. (2006). Two splice variants derived from a *Drosophila melanogaster* candidate ClC gene generate ClC-2-type Cl<sup>-</sup> channels. *Mol. Membr. Biol.* 23, 149–156.
- Földy, C., Lee, S.H., Morgan, R.J., and Soltész, I. (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel ClC-2. *Nat. Neurosci.* 13, 1047–1049.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992). Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759–762.
- Jordt, S.E., and Jentsch, T.J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582–1592.
- Lange, P.F., Wartosch, L., Jentsch, T.J., and Fuhrmann, J.C. (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* 440, 220–223.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Könst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., et al. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 831–838.
- López-Hernández, T., Ridder, M.C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V., et al. (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.
- 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., et al. (2011b). Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3266–3277.
- Lorenz, C., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1996). Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13362–13366.
- Makara, J.K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhäuser, C., Spät, A., and Kettenmann, H. (2003). Astrocytes from mouse brain slices express ClC-2-mediated Cl<sup>-</sup> currents regulated during development and after injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 521–530.
- Menichella, D.M., Majdan, M., Awatramani, R., Goodenough, D.A., Sirkowski, E., Scherer, S.S., and Paul, D.L. (2006). Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. *J. Neurosci.* 26, 10984–10991.
- Nagelhus, E.A., Mathiesen, T.M., and Ottersen, O.P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905–913.
- Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R.E., Lester, H.A., and Kofuji, P. (2001). Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J. Neurosci.* 21, 5429–5438.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Yusef, Y.R., Briones, R., and Sepúlveda, F.V. (2009). Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a ClC chloride channel by extracellular protons. *J. Physiol.* 587, 1387–1400.
- Rash, J.E. (2010). Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168, 982–1008.
- Ridder, M.C., Boor, I., Lodder, J.C., Postma, N.L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A.B., Estevez, R., Scheper, G.C., Mansvelter, H.D., and van der Knaap, M.S. (2011). Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain* 134, 3342–3354.
- Rinke, I., Artmann, J., and Stein, V. (2010). ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J. Neurosci.* 30, 4776–4786.
- Scheper, G.C., van Berkel, C.G., Leisle, L., de Groot, K.E., Errami, A., Jentsch, T.J., and Van der Knaap, M.S. (2010). Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 14, 255–257.
- Sik, A., Smith, R.L., and Freund, T.F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101, 51–65.
- Teijido, O., Martínez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Río, J.A., Palacín, M., and Estévez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2581–2594.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57–60.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., and Valk, J. (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., and 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., and Valk, J. (1996). Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.* 92, 206–212.
- Weinreich, F., and Jentsch, T.J. (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different ClC chloride channels. *J. Biol. Chem.* 276, 2347–2353.



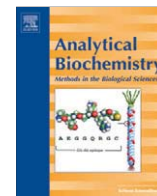
**Artículo aceptado en Enero de 2012 en la  
revista ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

## A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells

Xavier Capdevila-Nortes<sup>a,1</sup>, Tania López-Hernández<sup>a,1</sup>, Francisco Ciruela<sup>b</sup>, Raúl Estévez<sup>a,c,\*</sup><sup>a</sup>Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain<sup>b</sup>Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain<sup>c</sup>U-750, Centro de Investigación en Red de Enfermedades rara (CIBERER), 08907 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 November 2011

Received in revised form 18 January 2012

Accepted 23 January 2012

Available online xxxx

## Keywords:

Membrane proteins

Protein interaction

Split-TEV

## ABSTRACT

Despite progress in the development of methods to monitor protein interactions, studies of interactions between membrane proteins in mammalian cells remain challenging. Protein complementation assays (PCAs) are commonly used to study interactions between proteins due to their simplicity. They are based on interaction-mediated reconstitution of a reporter protein, which can be easily monitored. Recently, a protein complementation method named split-TEV (tobacco etch virus) has been developed and is based on the functional reconstitution of TEV protease and subsequent proteolytic-mediated activation of reporters. In this work, we have developed a modification of the split-TEV method to study the interactions between membrane proteins with increased specificity. This assay was validated by addressing the interactions between different membrane proteins, including G protein-coupled receptors (GPCRs) and ion channels. By comparing it with another PCA, we found that this new method showed a higher sensitivity.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Stable or transient protein–protein interactions (PPIs)<sup>2</sup> have important roles in many biological functions and every cellular process [1]. Especially important are the interactions between proteins at membranes because nearly one-third of the proteome consists of membrane proteins [2]. Furthermore, most currently available drugs are directed against membrane proteins [3].

The study of PPIs between membrane proteins is challenging because they are very hydrophobic, normally expressed at low levels, and live in a two-dimensional world (the cell membrane) that restricts their degree of movements. Interestingly, in bioluminescence resonance energy transfer experiments, it has been found that unspecific interactions between membrane proteins due to random interactions are found mainly at high expression levels

[4]. The fact that proteins reside in membranes may tremendously complicate the readout of the interaction assay because, for example, immunoprecipitation assays need the solubilization of membrane proteins [5], which may disrupt these interactions or even create additional ones by unspecific aggregation. Therefore, studying interactions between membrane proteins needs to be done very carefully, including many controls and with different methods. However, even when using different methods, contradictory results may occur. For example, many difficulties in assessing the oligomeric structure of some membrane proteins are well known [6,7].

An alternative to the solubilization/immunoprecipitation approach has been the study of these interactions in their native context. Protein complementation assays (PCAs) are becoming common methods to study membrane protein interactions [8,9]. Recently, a new type of PCA named split-TEV (tobacco etch virus) has been developed in mammalian cells and is based on the functional reconstitution of TEV protease and subsequent proteolytic-mediated activation of reporters [10–12]. This method offers a potential advantage over other methods because it is based on a simple and highly flexible readout, potentially with increased sensitivity.

However, some studies have shown that it may also detect unspecific interactions [13,14]. Starting with the original described split-TEV assay, we have performed several modifications leading to a higher increase in specificity, which allow us to study the

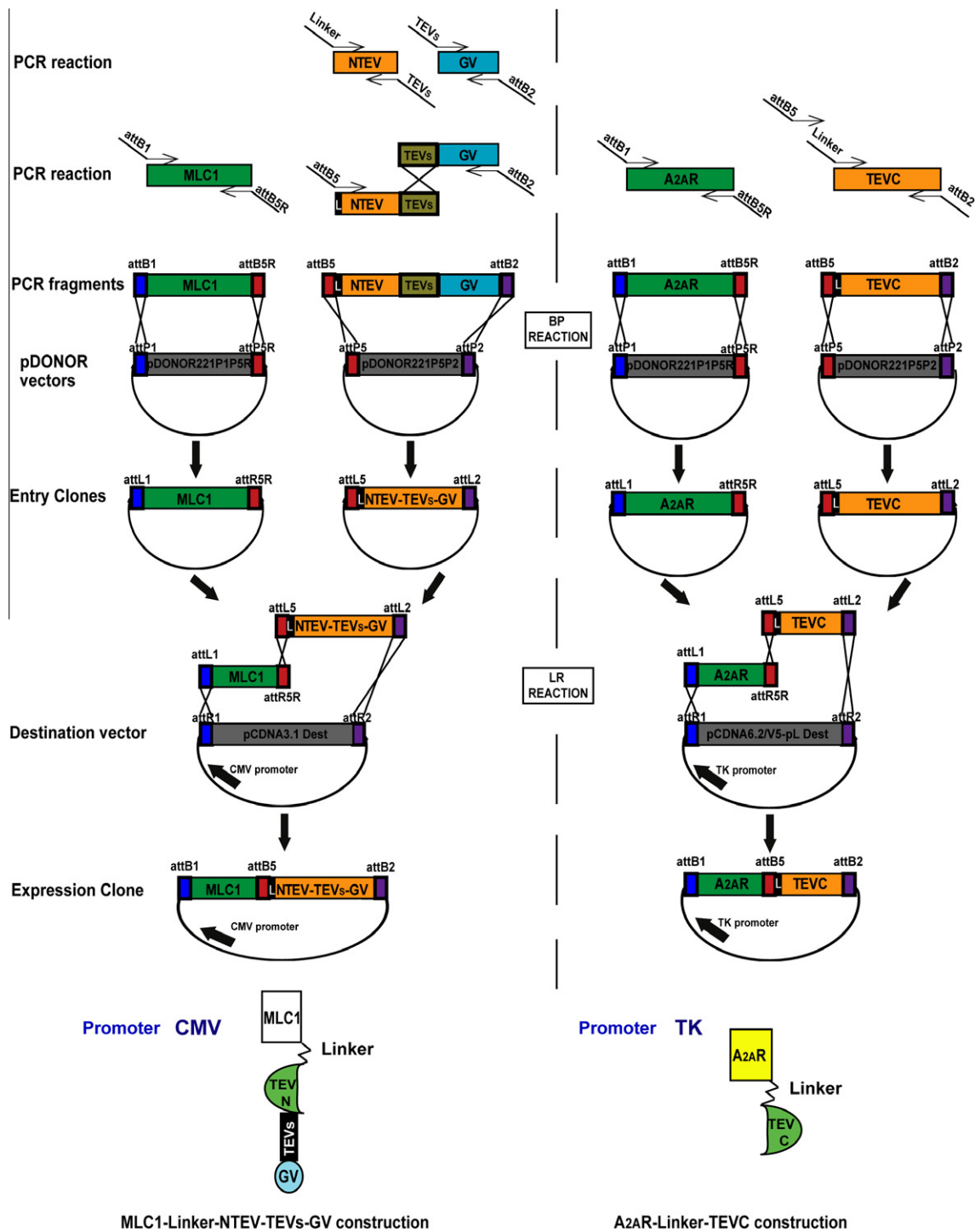
\* Corresponding author at: Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain.

E-mail address: [restevez@ub.edu](mailto:restevez@ub.edu) (R. Estévez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Abbreviations used: PPI, protein–protein interaction; PCA, protein complementation assay; TEV, tobacco etch virus; GPCR, G protein-coupled receptor; PCR, polymerase chain reaction; HSV, herpes simplex virus; TK, thymidine kinase; cDNA, complementary DNA; Gluc, *Gaussia* luciferase; PBS, phosphate-buffered saline; A<sub>2A</sub>R, A<sub>2A</sub> receptor; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; TEVsl, TEV substrate of reduced affinity; CMV, cytomegalovirus; D<sub>2</sub>R, dopamine D<sub>2</sub> receptor; TM, transmembrane.





**Fig.1.** Schematic representation of the cloning procedure of the two fusion proteins used in the final split-TEV method. Primers used are shown in Table 1. BP and LR reactions correspond to the Multisite Gateway System (Invitrogen).

75 interaction between different membrane proteins, including G  
76 protein-coupled receptors (GPCRs) [15] and ion channels.

77 **Materials and methods**

78 *Molecular biology*

79 All the expression plasmids were constructed by polymerase  
80 chain reaction (PCR) using a polymerase with proofreading activi-  
81 tude (KOD Hot Start polymerase, Calbiochem, Darmstadt,

Germany). For cloning the PCR products, we added the attB1, attB2, attB5R, or attB5 recombination sites compatible with the Multisite Gateway System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR products were recombined with the corresponding donor vector to obtain Gateway-compatible ENTRY clones. The ENTRY clones were recombined with pCDNA3.1 Dest vector (Invitrogen) or pCDNA6.2/V5-pL Dest containing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) promoter to obtain all of the different expression plasmids. All Gateway cloning procedures were performed according to the manufacturer's protocols (Invitrogen).

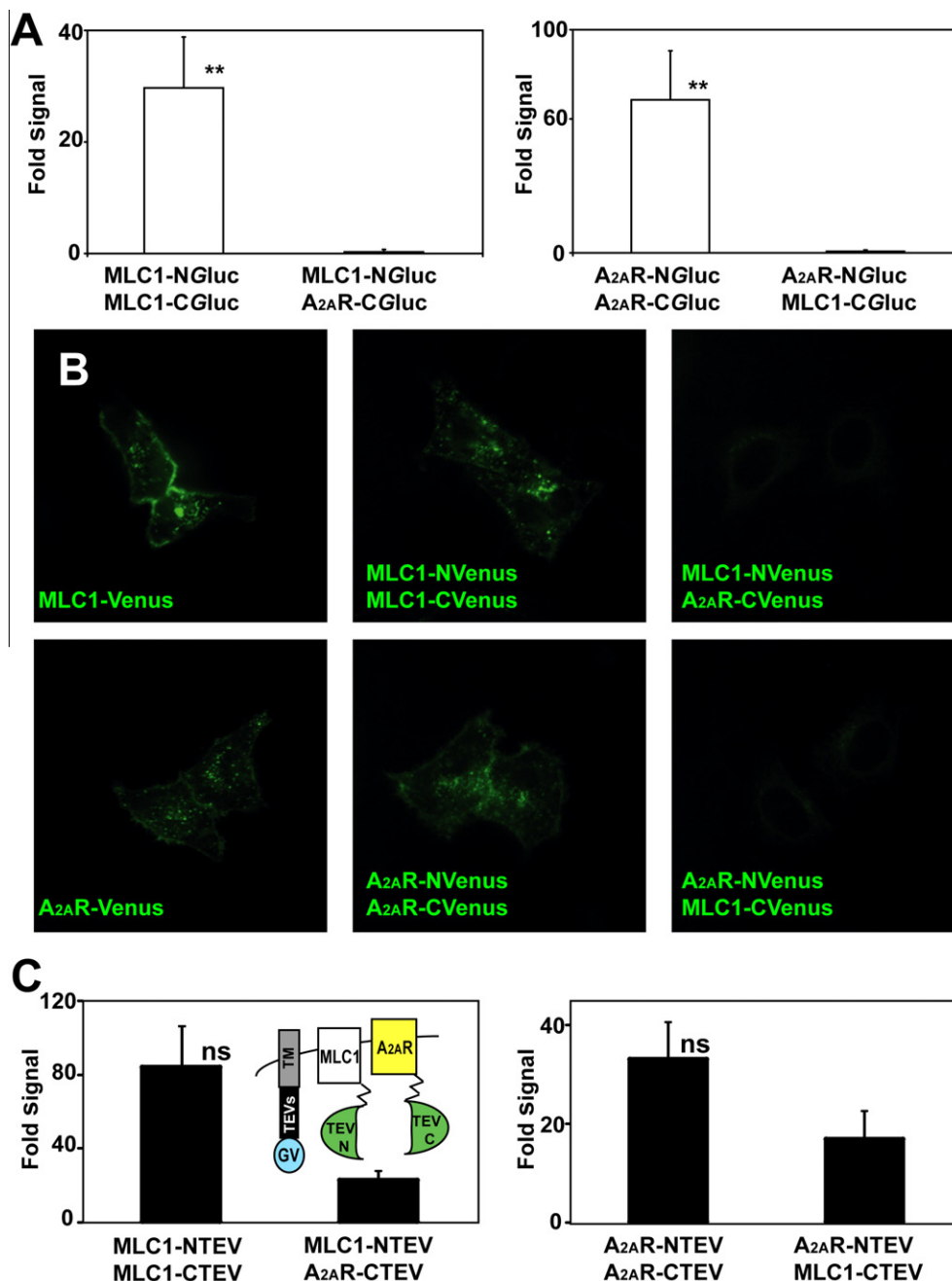
**Table 1**  
List of primers used in the current work.

Name/function	Sequence
<i>Gaussia luciferase complementation method</i>	
attB1 linker GLUC linker	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGCCACCGAGAAAC
attB2 linker GLUC linker	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGTACCACCGGCCCC
linker GLUC F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCACCATGAAGCCACCGAGAACAACAAGAC
linker GLUC R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGTACCACCGGCCCTTGATCTTGCCAC
attB2 linker GLUC-N linker	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCCTATGCCGCCTG
linker GLUC-N F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCTCCGGTAAGCCACCGACTACAACAAGAC
linker GLUC-N R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGCCTATGCCGCCTGTGGGACTC
attB1 linker GLUC-C linker	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGAGGCGATCGTC
linker GLUC-C F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCACCATGGAGGCGATCGTCGACATTCCTGAG
<i>Fluorescence complementation method</i>	
attB1 Venus	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGTGAAGAGGGC
attB2 Venus	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCAGCC
attB5 Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGACCATGGTGAAGAGGGC
attB5R Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTGTACAGCTCGTCCAT
attB5 linker Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGAGCCACCACTCCAGA
linker Venus F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCATGGTGAAGCCAGGACCTGTTACC
linker Venus R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCTTGTACAGCTCCATGCCAGAGTGAT
attB2 Venus-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGTCCGCGGTGATATA
linker Venus-N R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGTCCGCGGTGATATAGAGCTGTGGCTGT
attB1 Venus-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGCAGAAGAAC
linker Venus-C F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCCAAGCAGAAGCCGATCAACCCCACTTC
<i>Split-TEV method</i>	
attB1 TEV vector	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCG
attB2 TEV vector	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAATTTCATGAGTTGAGTCCG
linker TEV vector F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCGCGTATTACAACC
linker TEV vector R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCACTTCAATGAGTTGAGTCCGCTTCAACTGGC
attB2 TEV-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAGTTTGAAGTTGGTTCTCACAAGAC
linker TEV-N F	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCACTTGGAAAGTTGGTTGTACAAGACATAT
attB1 TEV-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATCAAGACCATGCTAGCATGGTGTG
linker TEV-C R	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCAAAGCATGCTAGCATCGTGTGACACACT
attB5 TEVS	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGAAAACCTGTACTTCCAAT
attB5R TEVS	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGKATTGGAAGTACAGGTTTTC
attB5R TEVSlA	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGAGTTGGAAGTACAGGTTTTC
TEVS GV F	GAAAACCTGTACTTCCAATMCATGAAGTACTGTCTTCTATCGAACCAAGCATG
TEVS GV R	GKATTGGAAGTACAGGTTTCCACCGTACTCGTCAATTCGAAGGCGATCGG
TEVSlA GV F	GAGTTGGAAGTACAGGTTTCCACCGTACTCGTCAATTCGAAGGCGATCGG
attB1 GV	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGTACTGTCTTCTATCGAACCAAGC
attB2 GV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACCACCGTACTCGTCAATTCGAAG
TEVS F	GAAAACCTGTACTTCCAATC
TEVS TEV-N F	GAAAACCTGTACTTCCAATCCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGCGGCCCG
TEVS TEV-N R	TTGGAAGTACAGGTTTTCAGTTTGAAGTTGGTTGTACAAAGACATATGCG
TEVSlA TEV-N F	GAAAACCTGTACTTCCAATCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCCG
<i>Membrane proteins fused to GV</i>	
attB5 TM	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGATGATGATCAAGCTAGATCAGC
attB2 TM	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAAAACCTATTGTCAATGTCCCAAC
<i>Membrane proteins tested</i>	
attB1 MLC1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGACCCAGGAGCCA
attB5R MLC1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTGGGCCATTTGCACCAC
attB1 A2AR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGCCCATCATGGCC
attB5R A2AR	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGACACTCCTGCTCCATC
attB1 D2R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGATCCACTGAAT
attB5R D2R	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGCAAGTGGAGGATCTTCAG
attB1 GLIALCAM	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGAGAGAAAGG
attB5R GLIALCAM	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGCGCTGATCTCCACCGG
attB1 CIC1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGAGCAATCCCGG
attB5R CIC1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTAAAGGATCAGTTTCATCCTC
attB1 CIC2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGCGGCCGGAAGCG
attB5R CIC2	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTGGCACTTGTCACTC
attB1 GLT1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGCATCAACCCAGGCGTCC
attB5R GLT1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTTTTTTCACGTTTCCAAGG

92 The integrity of all cloned constructs was confirmed by DNA  
 93 sequencing. All PCA fragments were fused to the protein of interest  
 94 with a linker consisting in the amino acid sequence  
 95 GGGGSGGGGS. A schematic representation of the design of two  
 96 fusion constructs used in the final split-TEV assay is shown in  
 97 Fig. 1. Primers used in the construction of the different plasmids  
 98 are indicated in Table 1.

*Cell culture and transfection*

99  
 100 HeLa cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in  
 101 Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma–Aldrich, St. Louis,  
 102 MO, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glu-  
 103 tamine, 100 U/ml streptomycin, 100 mg/ml penicillin, and 5% (v/v)  
 104 fetal bovine serum. The cells were seeded on plates and were tran-



**Fig.2.** Comparison among different PCA methods (*Gluc*, BiFC, and the reported split-TEV assay) on the interactions of two unrelated membrane proteins. (A) HeLa cells expressing MLC1 and A<sub>2A</sub>R fused to the indicated *Gluc* PCA fragments were studied by luminometric analysis in live cells. Fold signal was estimated by dividing the signal by the value of single transfectants. \*\**P* < 0.01 versus the hetero-oligomerization. Data correspond to 7 to 14 experiments. (B) HeLa cells expressing MLC1 and A<sub>2A</sub>R fused to the Venus protein or to the Venus PCA fragments were analyzed by microscopy imaging. Pictures correspond to a typical experiment from three experiments. (C) HeLa cells expressing MLC1 and A<sub>2A</sub>R fused to the TEV PCA fragments together with a single transmembrane (TM) protein containing the TEV recognition site (TEVs) and the transcription factor GV (a schematic representation is shown in the inset) were studied by luminometric analysis in live cells. Fold signal was estimated by dividing the signal by the value of the cells transfected only with the TM protein and the reporter plasmid. ns, no statistical significance versus the hetero-oligomerization. Data correspond to five experiments.

105 siently transfected with the corresponding complementary DNA  
106 (cDNA) constructs using Transfectin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)  
107 following the manufacturer's instructions.

108 *Bimolecular fluorescence complementation*

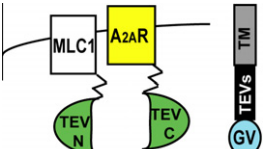
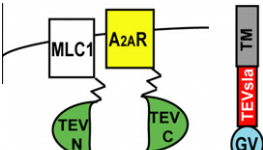
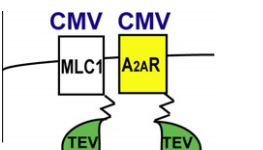
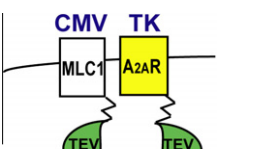
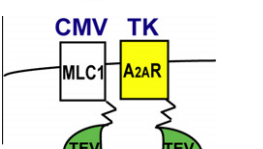
109 Plasmids containing the yellow fluorescent protein variant Ve-  
110 nus PCA fragments (N or C terminus) were constructed as de-  
111 scribed previously [16] and cotransfected in HeLa cells in a 1:1

ratio. After 48 h, cells were visualized using an Olympus DSU spin-  
ning disk confocal microscope (Barcelona, Spain). 112 113

*Gaussia luciferase complementation* 114

Plasmids containing the *Gaussia* luciferase (*Gluc*) PCA fragments  
(N or C terminus) were constructed as described previously [17]  
and cotransfected in HeLa cells in a 1:1 ratio together with  
pCMV-βGal vector at 1:10, which was used to monitor the trans- 115 116 117 118

**Table 2**  
Summary of modifications performed in reported split-TEV assay to improve its specificity.

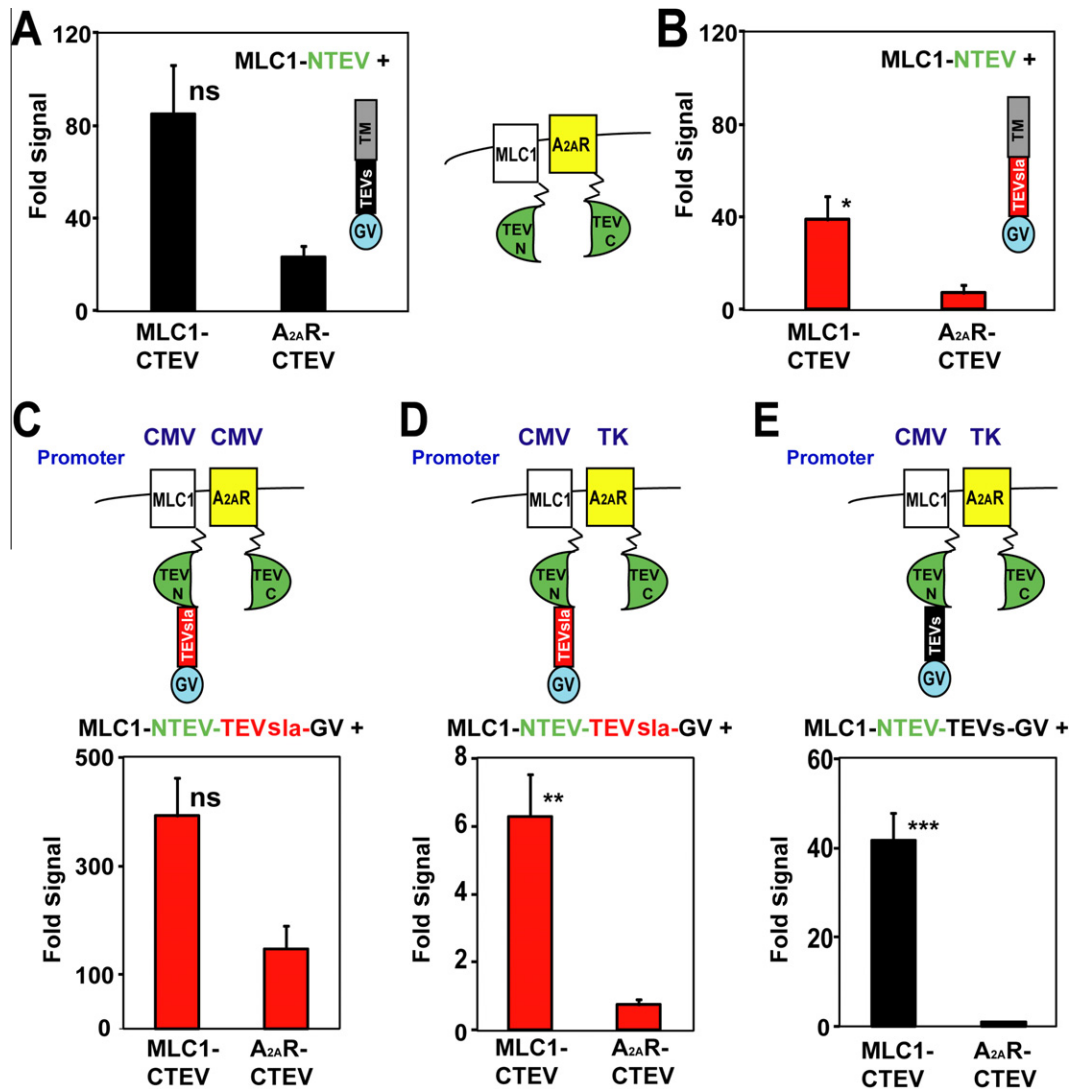
Scheme of proteins	Experimental group	RLUs Experimental group (RLUsignal/RLUpGAL) * 1000	Fold Experimental group (RLUsEXP/RLUs BACKG)	$R_s$ (MLC1-MLC1 Fold/MLC1-A <sub>2A</sub> R Fold)	<i>n</i>
	MLC1-MLC1	13704 ± 7380	84.5 ± 26.3	3.4 ± 1.2	5
	MLC1-A <sub>2A</sub> R	2759 ± 875	30.1 ± 8.1		
	Background	134 ± 58			
	MLC1-MLC1	449 ± 197	41.3 ± 12	4.8 ± 1.2	5
	MLC1-A <sub>2A</sub> R	80 ± 22	8.1 ± 1.8		
	Background	13 ± 7			
	MLC1-MLC1	1176 ± 322	389 ± 88	3.1 ± 0.8	6
	MLC1-A <sub>2A</sub> R	422 ± 119	138 ± 36		
	Background	4 ± 1			
	MLC1-MLC1	104 ± 68	6.3 ± 1.2	11.2 ± 3.0	11
	MLC1-A <sub>2A</sub> R	15 ± 10	0.9 ± 0.3		
	Background	13 ± 6			
	MLC1-MLC1	3609 ± 943	42.9 ± 7.6	56.6 ± 13.0	11
	MLC1-A <sub>2A</sub> R	78 ± 24	0.9 ± 0.1		
	Background	88 ± 18			

*Note.* At the left are schematic representations of the fusion proteins assayed and the experimental groups studied. Background experimental group corresponds to cells transfected only with the GV-fused protein. The relative light units (RLUs) of each experimental group shown correspond to the average luminescence signal (corrected by the  $\beta$ -gal luminescence signal; see Materials and Methods) of each combination. We also indicate the fold signal of each combination (RLUs of each experimental group divided by RLUs of the corresponding background). The  $R_s$  value corresponds to the ratio of specificity, indicating the ratio between the fold signal of the specific interaction (MLC1-MLC1) and the unspecific interaction (MLC1-A<sub>2A</sub>R). The last column shows the number of independent experiments performed (*n*). Values correspond to means ± standard errors.

119 fection efficiency. Next, 24 h after transfection, cells were trypsin-  
120 sized and plated in 35-mm dishes. Another 24 h later, medium was  
121 exchanged by phosphate-buffered saline (PBS). Native coelenter-  
122 azine (Nanolight Technology) was reconstituted as a stock solution  
123 of 1 mg/ml in methanol and diluted in PBS at a final concentration  
124 of 20  $\mu$ M. Medium was exchanged and immediately measured in a  
125 TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems, Madison, WI, USA).  
126 After measurement, to normalize the data, cells were solubilized  
127 and 30  $\mu$ l of the cell lysates was used to measure the  $\beta$ -galactosi-  
128 dase enzyme activity using a Luminiscent  $\beta$ -Galactosidase Detec-  
129 tion Kit II (Clontech, Nucliber, Spain) in the same luminometer.

### Split-TEV final method

130  
131 The final modification of the split-TEV method was performed  
132 as detailed below. To this end, a mutant form of the TEV protease  
133 (S219V) was used, which prevents its self-digestion but does not  
134 affect its catalytic efficiency [18]. The oligopeptide substrate used  
135 as the TEV protease recognition site was ENLYFQS (TEVs). The chi-  
136 meric transcription factor used was GV (obtained from the pM3-  
137 VP16 vector, Clontech), which contains the yeast Gal4DNA binding  
138 domain and the herpes simplex VP16 transactivation domain. In  
139 cases where the TEV affinity for its substrate was reduced, we used



**Fig.3.** Development of a new variant of the split-TEV method. (A, B) Reduction in the affinity between TEV and its recognition site. HeLa cells expressing the indicated fusion proteins (shown schematically in the middle panel: MLC1-TEVN, A<sub>2A</sub>R-TEVC) together with a transmembrane (TM) protein containing either the classical TEVs (A) or the low-affinity TEVs (TEVs<sup>sla</sup>) (B) were studied by luminometric assays in living cells. Fold signal was estimated by dividing the luminescence signal by the value of the cells transfected only with the TM protein fused to GV and the reporter plasmid. Data corresponds to five experiments. (C-E) Reduction in the distance between TEV and its recognition site at different expression levels. HeLa cells transfected with plasmids expressing the indicated fusion proteins, under the control of a strong (CMV) or weak (TK) promoter, were studied by luminometric assays in live cells. Fold signal was estimated by dividing the luminescence signal by the value of the cells transfected only with the MLC1-fused protein to GV and the reporter plasmid. Data correspond to 6 to 11 experiments. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; ns, no statistical significance versus the hetero-oligomerization in each case.

the substrate ENLYFQL (TEVs<sup>sla</sup>). After TEV protease cleavage, GV translocates into the nucleus and induces the reporter *Gaussia* luciferase gene expression (pNEBr-X1Gluc, New England Biolabs, Izasa, Spain), which is secreted into the cell culture medium.

TEV protease was divided into two fragments: the TEV-N (residues 1–118) and the TEV-C (residues 119–242). In one of the studied proteins, we fused the TEV-N fragment, the TEV protease recognition site, and the chimeric transcription factor GV. In the other protein, we fused the TEV-C fragment and they were cloned in a pCDNA6.2/V5-pL Dest, containing the HSV-TK promoter, to provide low levels of expression.

In a typical assay, HeLa cells plated in a 6-well plate were transiently transfected with the corresponding cDNA constructs. The total DNA transfected was 2 μg with the following ratios: 0.75 μg of each protein containing the TEV-N and TEV-C fragments, 0.3 μg of the reporter plasmid pNEBr-X1Gluc, and 0.2 μg of the pCMV-βGal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 h, 20 μl of medium was removed from the

supernatant of the cells and Gluc activity was measured in a TD-20/20 luminometer after the addition of 20 μM native coelenterazine. Data were normalized measuring the β-galactosidase enzyme activity as described above. Background levels correspond to cells transfected only with the GV-fused protein.

#### Statistical analyses

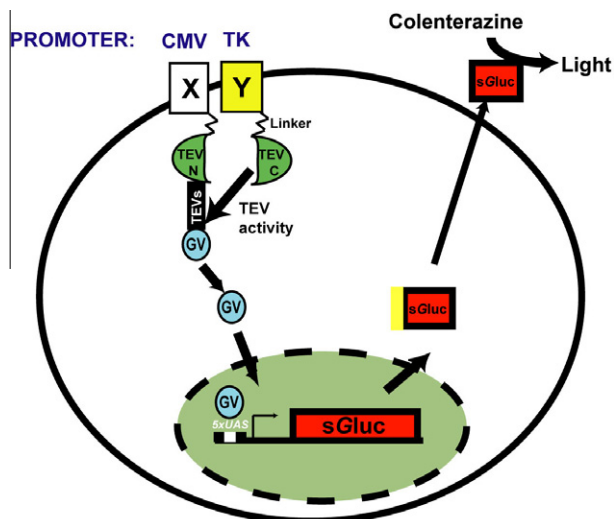
For determination of the statistical significance between groups, a Student's *t* test was used. Statistical significance is annotated in each figure. Values depicted are means ± standard errors.

## Results

### Unspecific interactions between membrane proteins in the split-TEV method

We aimed to use PCAs to detect interactions between membrane proteins because they are very simple and cost-effective.





**Fig.4.** Schematic representation of the final split-TEV method developed. Cells expressed a fusion of one protein of interest (X, in white) by a flexible linker to the TEV N-terminal PCA fragment, the TEV recognition site of normal affinity, and the transcription factor GV, under the control of a CMV promoter. The other protein of interest (Y, in yellow) is fused by a flexible linker to the TEV C-terminal PCA fragment, and its expression is controlled by the weak promoter TK. Interaction between the two proteins reconstitutes TEV protease activity, which releases a transcription factor (GV) that enters the nucleus and activates the expression of the reporter gene Gluc after binding to five Gal4 responsive elements ( $5 \times \text{UAS}$ ). The luciferase is released to the culture medium after peptide (in yellow) cleavage, and its activity is monitored by a luminometer after the addition of coelenterazine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

We selected two unrelated proteins: MLC1, the first protein defective in the leukodystrophy MLC [19], and the adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) [20], a GPCR. Different studies have demonstrated that both proteins are able to homo-oligomerize [19–21]. The first experiments using Gluc PCA [17] were able to detect homo-oligomerization of both proteins but not hetero-oligomerization between them (Fig. 2A). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies [16] showed similar results (Fig. 2B). However, split-TEV complementation assays were able to detect not only homo-oligomerization but also potential unspecific interactions between A<sub>2A</sub>R and MLC1 (Fig. 2C).

#### Modifications in split-TEV method

Because the split-TEV method has the advantage of potentially having increased sensitivity compared with other PCA methods [11], we aimed to modify it to improve its specificity. To follow the improvements after each introduced modification, we calculated a parameter, the ratio of specificity ( $R_s$ ), comparing the value of the specific signal of the MLC1 homo-oligomerization with the unspecific signal of the hetero-oligomerization between MLC1 and A<sub>2A</sub>R, in this manner being independent of background signal differences (Table 2).

First, we reasoned that reducing the interaction of the TEV protease by its substrate using a TEV substrate of reduced affinity may increase the specificity. Similar reasoning was done in another modification of the method called Tango [14]. Therefore, we compared the signal when using a TEV substrate of reduced affinity (TEVsla) [18,22] (Fig. 3A and B and Table 2). A small increase in specificity was observed with the TEVsla (from  $R_s$  values of 3.4–4.8). Thus, we maintained this configuration and performed further improvements.

Another approach used in the split-TEV method was to fuse one of the TEV PCA fragments together with the TEV substrate and the

transcription factor [10]. Because this fusion may avoid random collisions, we reasoned that a short distance between TEV protease and its substrate may also be beneficial to increase specificity. Therefore, the following modification addressed was to fuse the TEV PCA fragment and its substrate [10] (Fig. 3C). In this new configuration, however, the  $R_s$  value decreased slightly, although fold signal interaction levels were increased approximately 10 times (Table 2).

False interactions may also come from anomalous expression levels of the fused proteins. We considered that because the latest configuration showed a remarkable increase in fold signal interaction levels, the interaction between these membrane proteins may still be detectable after reduction of expression. Thus, we considered the possibility of reducing the expression of the studied proteins in this configuration by using a weaker promoter, HSV-TK. When the TK promoter directed the expression of the protein containing the TEV N-terminal PCA fragment together with the TEVsla and the transcription factor GV, no signal could be detected (data not shown). Therefore, expression of the GV-fused protein was kept under the control of a strong promoter, cytomegalovirus (CMV), keeping low the expression levels of the proteins fused to the TEV C-terminal PCA fragment. Under these experimental conditions,  $R_s$  increased from 3.1 to 11.2, although fold signal levels were also reduced approximately 60 times (Fig. 3D and Table 2). Importantly, the fold signal of the negative interaction MLC1–A<sub>2A</sub>R was close to 1, indicating that the luminescence interaction signal of this group was very similar to background levels.

Accordingly, because the reduction of expression caused the biggest increase in the specificity observed in all modifications, we performed another change maintaining the same configuration but returning back to the consensus TEVs [22] (Fig. 3E). As expected, fold signal levels were increased approximately 7 times, but more important was that the  $R_s$  value also increased dramatically, from 11.2 to 56.6 (Table 2).

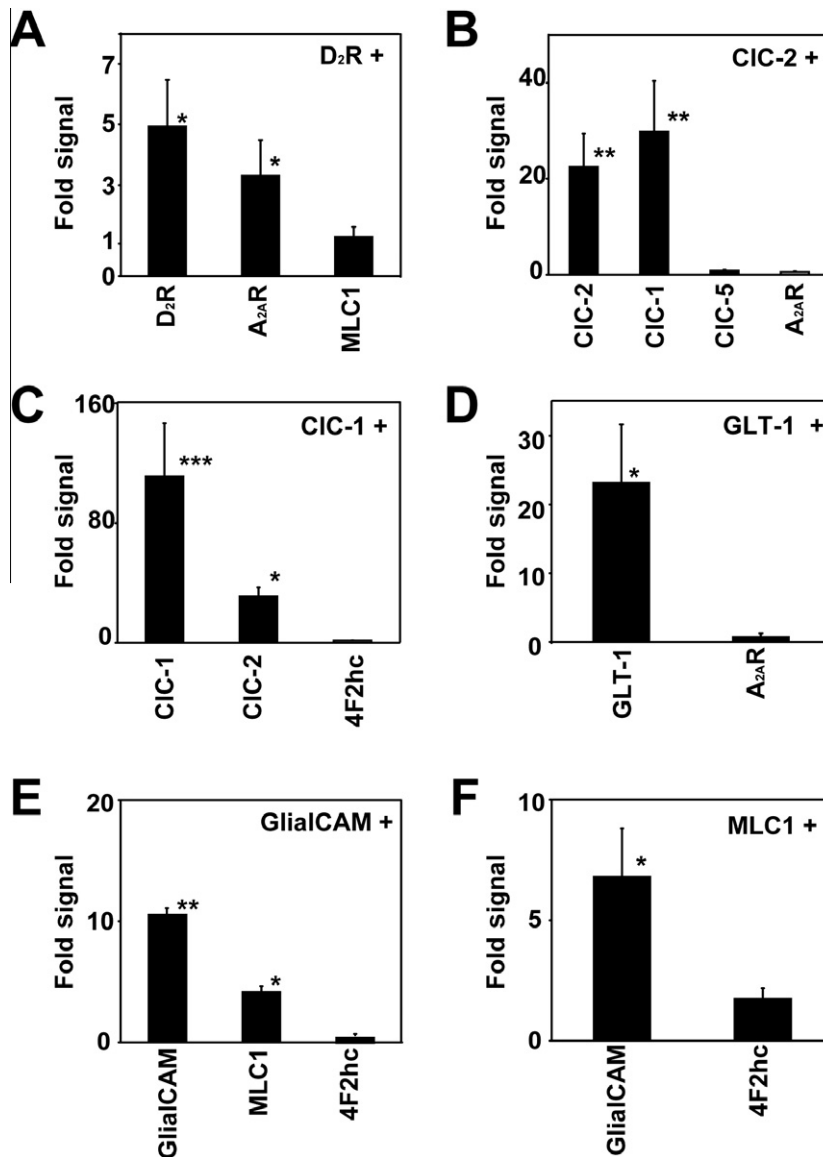
Overall, we concluded that the introduced modifications provided enough signal and specificity, and therefore this configuration was considered as the final variant of the split-TEV method (Fig. 4).

#### Validation of the new split-TEV method

To validate this variant, we monitored other membrane protein interactions (Fig. 5) and compared with the Gluc PCA (Fig. 6). First, we addressed protein–protein interactions between GPCR family members involving the dopamine D<sub>2</sub> receptor (D<sub>2</sub>R) (Fig. 5A). As described previously [20], D<sub>2</sub>R homo-oligomerization and hetero-oligomerization with A<sub>2A</sub>R were detected, whereas no interaction was observed between D<sub>2</sub>R and MLC1. Similar results were observed in Gluc PCA assays, although the hetero-oligomerization with A<sub>2A</sub>R was not statistically significant (Fig. 6A).

We also studied ion channels, addressing Cl<sup>−</sup> channels from the CLC family, which X-ray structures have proved are able to homo-oligomerize [23]. Using the modified split-TEV assays, we detected homo-oligomerization of CIC-2 and CIC-1 channels (Fig. 5B and C). In addition, we detected hetero-oligomerization between CIC-2 and CIC-1, in agreement with previous functional studies [24]. No interactions were observed with the following negative controls: the transporter CIC-5, the GPCR A<sub>2A</sub>R, and the unrelated single span transmembrane (TM) protein 4F2hc (Fig. 5B and C). In contrast, in Gluc PCA studies (Fig. 6B), it was not possible to detect even the homo-oligomerization of CIC-2.

Next, we studied the interaction of a membrane transporter, focusing on the glial glutamate transporter GLT-1, where structural studies have shown that it is able to homo-oligomerize [25]. Modified split-TEV assays detected homo-oligomerization of GLT-1 but no interaction with A<sub>2A</sub>R (Fig. 5D).



**Fig.5.** Application of the new split-TEV assay to detect interactions between different types of membrane proteins. The membrane proteins studied were D<sub>2</sub>R as a GPCR (A), CIC-2 and CIC-1 as ion channels (B, C), GLT-1 as a transporter (D), and GlialCAM and MLC1 as cell adhesion molecules (E, F). HeLa cells expressing a fusion of the indicated protein (top of the graph) to the TEV N-terminal PCA fragment, the TEV recognition site of normal affinity, and the transcription factor GV, together with the indicated protein (bottom of the graph) fused to the TEV C-terminal PCA fragment under the control of a low-expression promoter (TK) and the reporter plasmid, were studied by luminometric analysis in live cells. Fold signal was estimated by dividing the luminescence signal by the value of the cells transfected only with the indicated fused protein to GV and the reporter plasmid. Data correspond to at least three independent experiments. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; ns, no statistical significance versus the negative control (bottom right of the graph) in each particular case.

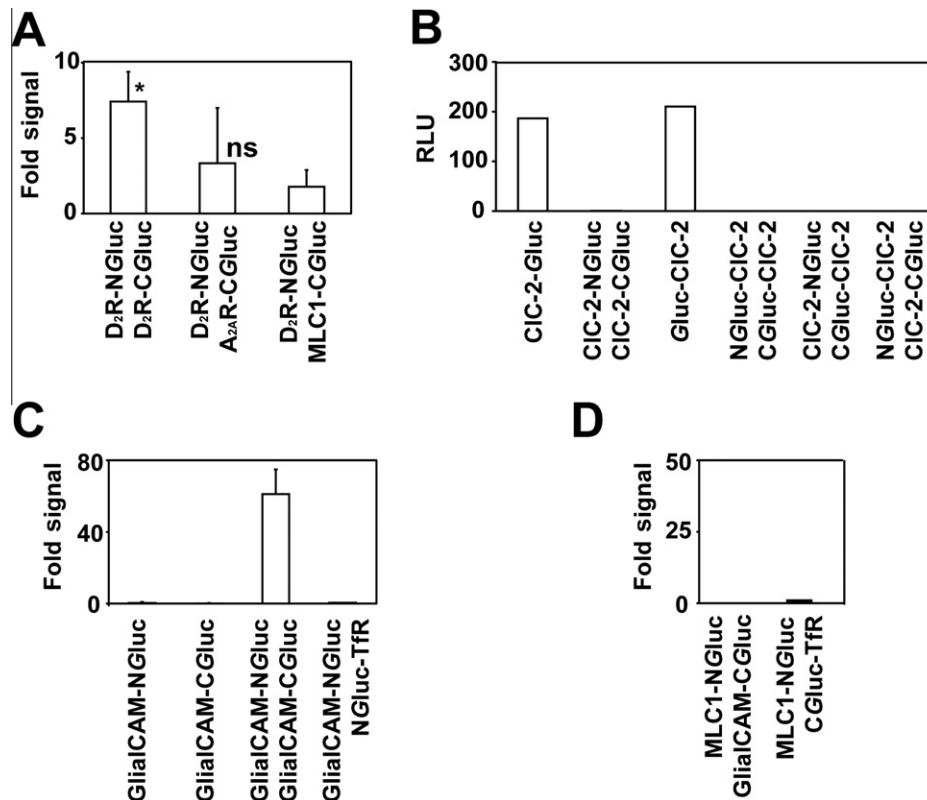
Finally, we studied the interaction between the cell adhesion molecules GlialCAM and MLC1, where coincident genetic and biochemical studies robustly proved their interaction given that both genes are involved in the leukodystrophy MLC [21,26]. Homo- and hetero-oligomerization between both proteins was also detected by the modified split-TEV assay (Fig. 3E and Fig. 5E and F), but Gluc PCA detected only the homo-oligomerization of MLC1 and GlialCAM and not their hetero-oligomerization (Fig. 2A and Fig. 6C and D).

## Discussion

The study of the interaction between TM proteins is technically very challenging [2]. Actually, the most common method used to study interaction between membrane proteins is the split-ubiquitin system, which uses yeast as an expression system [9]. The split-

TEV assay described here is performed in mammalian cells, and it offers good perspectives because it is very flexible and the interactions are amplified through a transcriptional readout [10]. Our work has shown that the interaction between complex membrane proteins using this method required several improvements.

Using a pair of multispansing proteins that do not interact, we propose that false interactions arise mainly from protein overexpression. Similar results were found by another group studying the interaction of two membrane proteins involved in cholesterol homeostasis; specific interactions were detected only at low levels of expression [27]. It is possible that not all types of membrane proteins needed this reduction of expression levels using a weak promoter given that some positive results already exist for some membrane proteins in the original described method [10]. Probably, those proteins with a higher content of hydrophobic amino acids should be optimized because they will have a higher tendency to aggregate. Alternatively, the specificity of the interactions



**Fig.6.** Gluc PCAs for some membrane proteins that were also studied by split TEV. The membrane proteins studied were the GPCR dopamine D2 receptor (D<sub>2</sub>R) (A), the chloride channel CIC-2 (B), and the cell adhesion molecules GlialCAM and MLC1 (C, D). HeLa cells expressing the indicated proteins fused to the Gluc PCA fragments were studied by luminometric analysis in live cells. Fold signal was estimated by dividing the luminescence signal by the value of single transfectants. In panel B, signal is expressed directly as relative light units (RLU) to indicate the value of the luminescence of the fusion of the full-length Gluc to the CIC-2 ion channel. In panels C and D, the transferring receptor (Tfr) is used as a negative control. \**P* < 0.05; ns, no statistical significance versus the negative control (bottom right in each particular case). Data correspond to at least three independent experiments.

may depend on the expression system used because expression levels will also change between different expression systems.

When the complementation between the assayed fragments is reversible, as happens in the complementation of Gluc [17], we predict that only those interactions with increased affinity will be detected. In contrast, in the case of the TEV protease, which probably shows an irreversible association [13], all interactions will be detected and amplified.

Comparing the new split-TEV with the Gluc PCAs, we have shown that the modified split-TEV assay has a higher sensitivity, as observed in the studied interactions between the CLC Cl<sup>-</sup> channels or between the adhesion molecules GlialCAM and MLC1. In our hands, the signal of the reconstitution of Gluc PCA fragments is approximately 5% of the signal of the complete Gluc-fused protein. Therefore, only when the complete Gluc-fused proteins have a high signal could they be potentially studied by the Gluc PCA.

The modified split-TEV assay described here uses as a reporter gene the expression of a secretable form of Gluc. With this approach, the detection of the interactions is technically very easy. This is possible due to the high stability of Gluc and the fact that its activity is quite resistant to changes in pH or ionic strength [28,29]. In addition, the detection of Gluc activity does not imply the disruption of the cells, and they can be processed for further studies. We suggest that this improved split-TEV method could be very suitable for high-throughput studies.

In conclusion, this new split-TEV method offers very good perspectives to monitor interactions between complex membrane proteins in mammalian cells with specificity and sensitivity in a very simple and robust assay.

**Acknowledgments**

We thank Moritz J Rossner for help during the initial steps of this project. We thank Alejandro Barrallo for reviewing the manuscript. This study was supported in part by SAF 2009-07014 (R.E.), PS09/02672-ERARE (R.E.), the ELA Foundation 2007-017C4 project (R.E.), 2009 SGR 719 (R.E.), SAF2008-01462 (F.C.), and CSD2008-00005 (F.C.). R.E. and F.C. are recipients of an ICREA Academia prize.

**References**

- [1] J. Petschnigg, J. Snider, I. Stagljar, Interactive proteomics research technologies: recent applications and advances, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 50–58.
- [2] J. Petschnigg, O.W. Moe, I. Stagljar, Using yeast as a model to study membrane proteins, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20 (2011) 425–432.
- [3] J.P. Overington, B. Al-Lazikani, A.L. Hopkins, How many drug targets are there?, *Nat Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 993–996.
- [4] J.R. James, M.I. Oliveira, A.M. Carmo, A. Iaboni, S.J. Davis, A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer, *Nat. Methods* 3 (2006) 1001–1006.
- [5] C.S. Muller, A. Haupt, W. Bildl, J. Schindler, H.G. Knaus, M. Meissner, B. Rammner, J. Striessnig, V. Flockerzi, B. Fakler, U. Schulte, Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 14950–14957.
- [6] M. Chabre, R. Cone, H. Saibil, Biophysics: Is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature* 426 (2003) 30–31 (discussion on p. 31).
- [7] D. Fotiadis, Y. Liang, S. Filippek, D.A. Saperstein, A. Engel, K. Palczewski, Atomic-force microscopy: rhodopsin dimers in native disc membranes, *Nature* 421 (2003) 127–128.
- [8] J. Snider, S. Kittanakom, D. Damjanovic, J. Curak, V. Wong, I. Stagljar, Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1281–1293.



- [9] J. Snider, S. Kittanakom, J. Curak, I. Stagljar, Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: A powerful tool for identifying protein–protein interactions, *J. Vis. Exp.* (36) (2010) 1–7, doi: 10.3791/1698.
- [10] M.C. Wehr, R. Laage, U. Bolz, T.M. Fischer, S. Grunewald, S. Scheek, A. Bach, K.A. Nave, M.J. Rossner, Monitoring regulated protein–protein interactions using split TEV, *Nat. Methods* 3 (2006) 985–993.
- [11] M.S. Djannatian, S. Galinski, T.M. Fischer, M.J. Rossner, Studying G protein-coupled receptor activation using split-tobacco etch virus assays, *Anal. Biochem.* 412 (2011) 141–152.
- [12] M.C. Wehr, L. Reinecke, A. Botvinnik, M.J. Rossner, Analysis of transient phosphorylation-dependent protein–protein interactions in living mammalian cells using split-TEV, *BMC Biotechnol.* 8 (2008) 55.
- [13] D.C. Gray, S. Mahrus, J.A. Wells, Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease, *Cell* 142 (2010) 637–646.
- [14] G. Barnea, W. Strapps, G. Herrada, Y. Berman, J. Ong, B. Kloss, R. Axel, K.J. Lee, The genetic design of signaling cascades to record receptor activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 64–69.
- [15] M.C. Lagerstrom, H.B. Schioth, Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 339–357.
- [16] S.W. Michnick, P.H. Ear, C. Landry, M.K. Malleshaiah, V. Messier, A toolkit of protein-fragment complementation assays for studying and dissecting large-scale and dynamic protein–protein interactions in living cells, *Methods Enzymol.* 470 (2010) 335–368.
- [17] I. Remy, S.W. Michnick, A highly sensitive protein–protein interaction assay based on *Gussia* luciferase, *Nat. Methods* 3 (2006) 977–979.
- [18] R.B. Kapust, J. Tozser, J.D. Fox, D.E. Anderson, S. Cherry, T.D. Copeland, D.S. Waugh, Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency, *Protein Eng.* 14 (2001) 993–1000.
- [19] O. Tejjido, A. Martinez, M. Pusch, A. Zorzano, E. Soriano, J.A. Del Rio, M. Palacin, R. Estevez, Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 2581–2594.
- [20] F. Ciruela, M. Gomez-Soler, D. Guidolin, D.O. Borroto-Escuela, L.F. Agnati, K. Fuxe, V. Fernandez-Duenas, Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1808) 1245–1255.
- [21] T. Lopez-Hernandez, S. Sirisi, X. Capdevila-Nortes, M. Montolio, V. Fernandez-Duenas, G.C. Scheper, M.S. van der Knaap, P. Casquero, F. Ciruela, I. Ferrer, V. Nunes, R. Estevez, Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 3266–3277.
- [22] R.B. Kapust, J. Tozser, T.D. Copeland, D.S. Waugh, The P1' specificity of tobacco etch virus protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 (2002) 949–955.
- [23] T.J. Jentsch, M. Poet, J.C. Fuhrmann, A.A. Zdebik, Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models, *Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 779–807.
- [24] C. Lorenz, M. Pusch, T.J. Jentsch, Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 13362–13366.
- [25] D. Yernool, O. Boudker, Y. Jin, E. Gouaux, Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*, *Nature* 431 (2004) 811–818.
- [26] T. Lopez-Hernandez, M.C. Ridder, M. Montolio, X. Capdevila-Nortes, E. Polder, S. Sirisi, A. Duarri, U. Schulte, B. Fakler, V. Nunes, G.C. Scheper, A. Martinez, R. Estevez, M.S. van der Knaap, Mutant GLIALCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism, *Am. J. Hum. Genet.* 88 (2011) 422–432.
- [27] T. Yang, P.J. Espenshade, M.E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J.L. Goldstein, M.S. Brown, 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 (2002) 489–500.
- [28] T. Rathnayaka, M. Tawa, S. Sohya, M. Yohda, Y. Kuroda, Biophysical characterization of highly active recombinant *Gussia* luciferase expressed in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 2010 (1804) 1902–1907.
- [29] S.B. Kim, H. Suzuki, M. Sato, H. Tao, Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8732–8740.



