



Estudis bioquímics i funcionals de les proteïnes implicades en la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals

Xavier Capdevila Nortés

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

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

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



**Estudis bioquímics i funcionals de les
proteïnes implicades en la
Leucoencefalopatia
Megalencefàlica amb Quists subcorticals**

**Tesi doctoral: Xavier Capdevila Nortes
Departament de Ciències Fisiològiques II, Unitat de
Fisiologia
Universitat de Barcelona 2013**

**Director:
Raúl Estévez Povedano
Departament de Ciències Fisiològiques II, UB**

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Memòria presentada per optar al grau de doctor per la Universitat
de Barcelona, 2013

XAVIER CAPDEVILA NORTES

L'interessat,

Xavier Capdevila Nortes

El director de la tesi,

Raúl Estévez Povedano

Departament de Ciències Fisiològiques II, UB.

AGRAÏMENTS

Durant aquests 5 anys de feina hem viscut moltes coses bones i dolentes tant a nivell personal com a nivell laboral i ja que l'escriptura i la defensa d'aquesta Tesi representen el final d'aquesta etapa, és el moment de reflectir en aquestes primeres línies el meu agraïment cap a totes les persones que he tingut al meu voltant.

Primer de tot agrair al Dr. **Raúl Estévez** l'oportunitat de poder realitzar la Tesi doctoral. Raúl, gràcies per haver confiat en mi durant aquests anys i obrir-me la porta del teu laboratori perquè jo em pogués formar. Espero que tota la feina que he realitzat i que queda al grup ajudi a tots els nous membres a avançar amb la recerca que tant t'apassiona.

Una Tesi és un treball individual però que no es pot aconseguir sense uns bons companys.

Anna, moltes gràcies per la teva paciència amb mi quan vaig començar. Tu vas ser com la meva primera post-doc. Vas ser un gran exemple de com pensar i treballar els experiments i de com organitzar-se el dia per poder arribar a fer-ho tot. Per altra banda, vas ser un exemple de vida i de forma de pensar i vam riure molt junts. Em vas demostrar i em demostres que amb tu hi podré comptar sempre.

Tania mi niña, juntos hemos podido con todo! Sabes que te considero de las mejores personas que he conocido y ya sabes de sobra todo lo que pienso de ti como persona y como científica. Has sido mi *partner* perfecta durante todos estos años y has hecho de compañera de trabajo, post-doc y sobre todo amiga durante unos años durísimos para ti. Nunca olvidaré lo que has hecho por mí y me tendrás a tu lado siempre que lo necesites. De lo mejor que me llevo de esta Tesis es haberme cruzado contigo en el camino.

Sònia, a tu tampoc podré tornar-te mai tot el que m'has donat durant aquesta anys que hem coincidit. Ets la companya ideal i les nostres xerrades sobre ciència passaran a la història. Ha sigut un autèntic privilegi tenir-te al costat perquè tot ho has fet més fàcil i els farts de riure que ens hem fet tampoc ens els treu ningú! Vals molt i només t'ho has d'acabar de creure. Espero que tot el què jo he fet bé i malament et serveixi per encarar millor el final de la Tesi que n'estic convençut que serà fantàstica. Amb tu

m'emporto una amiga per tota la vida. Moltes gràcies per la teva paciència i pel teu afecte.

Tanit, l'alegria del laboratori! Gràcies per entrar sempre somrient passés el què passés, fins hi tot en moments molts durs per tu. Espero haver-te ajudat i vull que sàpigues que ho continuaré fent sempre que ho necessitis. No oblidaré mai els "piques" sobre Barcelona, els partits i les xerrades del Barça i sobretot la teva vitalitat. Tu m'has ensenyat a que no tot s'acaba amb la feina i tot i que crec que no ho he sabut fer bé, et prometo que intentaré aprofitar cada moment i em centraré en les coses realment importants. Molts ànims amb l'última etapa de la Tesi que serà dura però que te'n sortiràs de sobres. Saps que tens un amic per sempre.

I arriba el moment d'agrair als post-docs reals que he tingut durant aquests anys. **Alejandro**, encara que no hem coincidit en projectes he après moltes coses de tu. Gràcies per ajudar-me en tot el què t'he preguntat sempre que ha fet falta i per posar el punt crític a les coses. Tu m'has ensenyat com treballa un post-doc i espero poder-ho aplicar ben aviat. **Marisol**, gràcies pels moments de cafè i les xerrades per desconnectar en alguns moments que feien molta falta.

I no m'oblidaré de la gent nova que continuarà amb tota la feina del grup. **Héctor**, **Carla** i **Xabi**, hem coincidit molt poquet però ja n'hi ha hagut prou per portar-nos molt bé. Molts ànims amb la vostra Tesi doctoral i amb tot el què feu a la vida, sou molt bons en tots els sentits i no heu de deixar que us treguin la il·lusió.

I està clar que una part d'aquest agraïment va dirigida a tota la **família de Bellvitge**. Qui millor que vosaltres per entendre com et sents en tot moment i donar un cop de mà. Com que sé que em deixaria algú i no vull que ningú es pensi que no es mereix la meva gratitud no posaré cap nom. Moltes gràcies a tots els que m'heu ajudat en algun moment o altra amb una xerrada al passadís, amb un experiment o fent una cervesa al final del dia.

També voldria agrair a la Dra. **Virginia Nunes** i al Dr. **Manel Chiva** el vostre suport, afecte i interès per la meva feina i per la meva vida personal. I especialment als Drs. **Francisco Ciruela**, **Miguel López de Heredia**, **Xavier Gasull**, **Elena Jeworutzki**, **Marjo van der Knaap** i **Michael Pusch** per l'esforç i treball en els projectes de col·laboració que hem realitzat conjuntament.

Finalment agrair als Drs. **Anna Planas**, **José Julio Chillarón**, **José M. Fernández**, **Avelina Tortosa**, **Tomàs Santalucía** i **Rubén Vicente** per haver acceptat a formar part del meu tribunal de Tesi.

I gairebé igual o més important que l'entorn laboral ha sigut l'entorn personal. Per mi ha sigut molt important poder distreure la ment en moments puntuals i per això vull agrair a la gent de **No M'atabalis** el seu suport. Especialment agrair al **Lluís**, la **Maria**, la **Mamen**, la **Vane**, la **Yoli**, el **Ramón**, l'**Anna**, el **Jordi "Madro"**, el **Joan**, l'**Ernest** i la **Txell** el vostre interès i la vostra ajuda incondicionals.

També m'agradaria dedicar unes línies a unes persones molt especials per mi. **Adrià**, tu representes la millor manera d'entendre l'amistat i encara que no ens veiem mai, sempre t'he sentit i t'he tingut al meu costat des que ens vam conèixer. Saps que sempre estarem junts quan em necessitis. **Salva** i **Ruth**, sou els millors amics que una persona pot tenir. Moltes gràcies pel vostre suport incondicional en tot, per ajudar-me a pensar, a viure i a riure i per ensenyar-me moltes més coses que les que us penseu. Gràcies per oferir-vos en tot moment a ajudar-me en qualsevol cosa.

I crec que la família són les persones que han d'ocupar l'últim espai d'aquests agraïments. He tingut sort de formar part d'una família que tot i els mals moments ha estat sempre unida i m'ha ensenyat moltes coses.

Gràcies als tiets **Toni** i **Gemma** per donar-me la oportunitat de començar a formar-me com a biòleg i per "enfadar-vos" perquè no us explico mai res.

Tieta **Maria**, des de ben petit m'has ajudat en tot, m'has ensenyat moltes coses i sempre m'has fet sentir a gust amb mi mateix. Hem compartit moltes coses i no s'acaben aquí! Ets un exemple per mi i et mereixes tots els agraïments del món.

Una de les persones més importants per mi és la iaia **Pilar**. Moltes gràcies pel teu suport, per entendre'm sempre o si més no intentar-ho, i per demostrar-me cada dia que estàs al meu costat pel què faci falta. M'has ensenyat moltes coses i no ho has deixat de fer en cap moment. També m'agradaria recordar a l'avi **Jaume** i la iaia **Mercè**. Encara que no hagueu estat aquí per veure'm realitzar la Tesi, em veu ensenyar tantes coses quan era més petit que també teniu molta culpa que jo hagi arribat on he arribat. Allà on estigueu sé que estareu orgullosos de mi igual que jo estic molt orgullós d'haver-vos tingut al meu costat.

Sergi i Sílvia, amb vosaltres dos no sé ni per on començar. Gràcies per estar al meu costat, per preguntar, per interessar-vos i per preocupar-vos. Possiblement no he estat a l'altura del què esperàveu de mi però no ho he sabut fer millor. He intentat mantenir a tothom al marge de problemes i mal de caps i això potser ha impedit que us sentíssiu importants però això no és així. Sou de les persones més importants de la meua vida. Sergi, com a germans tenim moltes diferències però ningú podrà dir mai que no t'hagi tingut sempre al meu costat per tot el què ha fet falta i sempre he sentit que et senties orgullós de mi. Has de saber que jo sóc com sóc en part gràcies a tu i ara és l'hora que t'agraeixi tot el què has fet, fas i sé que faràs per mi. Que sàpigues que sempre t'ajudaré sempre que ho necessitis. Sílvia, tu ets la cunyada perfecte, sempre rient, sempre positiva i a la vegada preocupada perquè tot surti bé. Gràcies per tractar-me sempre tant bé i per ajudar-me.

I als meus pares **Antonio i Vicky** moltes gràcies per absolutament tot. Gràcies a vosaltres sóc la persona que sóc. M'heu ensenyat a pensar, a valorar les coses, a esforçar-me i m'heu donat la millor educació que una persona pot rebre. Gràcies al vostre esforç he pogut fer sempre el què m'ha agradat fer i he pogut estudiar i formar-me per acabar realitzant aquesta Tesi doctoral. Sou el millor exemple de persones i pares que es pot tenir i mai us podré agrair tot el què heu fet i el què heu deixat de fer perquè jo pogués realitzar-me com a persona.

I finalment les últimes paraules són per la **Meri**. Aquesta Tesi és per tu. Mai podré tenir cap paraula negativa cap a tu, has aguantat l'inaguantable i m'has ajudat tot el què has pogut i més. Moltes vegades t'has trobat amb un mur al davant i mica en mica has aconseguit destruir-lo perquè jo pogués estar millor. Moltes gràcies pel teu suport incondicional, moltes gràcies per ser com ets i moltes gràcies per voler estar al meu costat. Sense tu no ho hagués aconseguit.

I després de molts assajos de TEV, constructes, immunos, 86311 cèl·lules contades una a una i una fractura d'húmer que m'ha deixat un braç una mica tort, s'acaba l'etapa doctoral amb aquesta Tesi.

Moltes gràcies a tots per ajudar a fer-ho possible.

ÍNDIX GENERAL

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES.

INTRODUCCIÓ.	1
1. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC), UN EXEMPLE DE LEUCODISTRÒFIA.	3
1.1. Classificació de les leucoencefalopaties.	4
1.2. La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC).	5
1.2.1. Característiques clíniques de la malaltia.	6
1.2.2. Genètica.	10
1.2.3. La proteïna MLC1	13
1.2.3.1. Expressió i localització de la proteïna MLC1.	14
1.2.3.2. Estructura i funció de MLC1.	15
1.2.3.3. Mutacions de <i>MLC1</i>	17
1.2.4. La proteïna GlialCAM.	18
1.2.4.1. Expressió i localització de la proteïna GlialCAM.	19
1.2.4.2. Estructura i funció de GlialCAM.	20
1.2.4.3. Mutacions de <i>GLIALCAM</i> .	22
1.2.5. Relació de CIC-2 amb MLC.	23
1.2.6. Tractament per pacients de MLC.	24
2. FISIOLOGIA I FUNCIO ASTROCITÀRIA.	25
2.1. Regulació del volum cel·lular.	26
2.1.1. Regulació del volum en astròcits.	27
2.1.1.1. Sensors volumètrics i osmotransducció.	28
2.1.1.2. Vies de transport d'osmòlits.	29
2.2. Tamponament del potassi extracel·lular.	32
2.2.1. Tamponament espacial de potassi (<i>potassium siphoning</i>).	32
2.2.2. Absorció de potassi.	33
2.3. Formació de xarxes entre cèl·lules gials.	35
3. MÈTODES PER L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES.	38
3.1. Mètodes bioquímics.	39
3.1.1. Coimmunoprecipitació (Co-IP).	40
3.1.2. Immunoprecipitació per afinitat (AP).	40
3.1.3. <i>Cross-linking</i> .	41
3.1.4. Tècnica de <i>Blue Native Page</i> .	41

3.2. Sistema de doble híbrid en llevats (Y2H).	42
3.3. Mètodes basats en la complementació de fragments de proteïna (PCA).	43
3.3.1. Sistema de doble híbrid de membrana en llevats (MYTH).	44
3.4. Mètodes basats en la transferència d'energia de ressonància (RET).	45
3.5. Mètode de BioID.	47
3.6. Mètode de <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).	49
3.7. Tècnica d' <i>Isotope labeling by aminoacids in cell culture</i> (SILAC).	50
3.8. Microarrays de proteïnes.	52
3.9. Mètode de <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR).	53
OBJECTIUS.	55
MATERIALS I MÈTODES.	59
1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.	61
1.1. Obtenció de bacteris electrocompetents i transformació del DNA.	61
1.1.1. Mètode d'obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència.	61
1.1.2. Transformació de bacteris.	62
1.1.2.1. Mètode per electroporació.	62
1.1.2.2. Mètode per xoc tèrmic (<i>Heat shock</i>).	63
1.2. Obtenció i purificació del DNA plasmídic.	64
1.2.1. Minipreparacions.	64
1.2.2. Maxipreparacions.	65
1.2.3. Precipitació del DNA.	67
1.2.4. Quantificació del DNA.	67
1.2.5. Seqüenciació del DNA.	68
1.3. Clonatge de DNA plasmídic.	68
1.3.1. Reacció de PCR.	69
1.3.2. Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (<i>splicing by overlap extension</i>).	70
1.3.3. Clonació clàssica.	72
1.3.3.1. Digestió amb enzims de restricció.	72
1.3.3.2. Electroforesis de DNA en gels d'agarosa.	73
1.3.3.3. Purificació del DNA.	74
1.3.3.4. Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina.	75
1.3.3.5. Lligació.	75
1.3.4. Clonació per recombinació mitjançant el sistema <i>Gateway</i> (Invitrogen).	76

1.3.4.1. Clonatge amb el sistema Gateway simple.	77
1.3.4.2. Reacció <i>attB</i> x <i>attP</i> . Construcció de <i>Entry Clones</i> .	77
1.3.4.3. Reacció <i>attL</i> x <i>attR</i> . Construcció de vectors d'expressió.	78
1.3.4.4. Clonatge amb el sistema <i>Gateway MultiSite</i> de 2 fragments.	79
1.3.4.5. Utilització del <i>software Vector NTI</i> per la construcció virtual de clons.	80
1.3.5. Generació de miRNAs.	81
1.3.5.1. Disseny i construcció d'adenovirus que codifiquen per miRNAs.	82
1.4. Obtenció de RNA missatger i construcció de RNA missatger transcrit <i>in vitro</i> .	84
1.4.1. Normes generals en la manipulació del RNA.	84
1.4.2. Obtenció de RNA missatger a partir de cèl·lules en cultiu.	85
1.4.3. Construcció de RNA missatger transcrit <i>in vitro</i> .	85
2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES.	87
2.1. Obtenció de proteïna total.	87
2.1.1. Obtenció de proteïna total a partir de cèl·lules i de teixit.	87
2.1.2. Determinació de la concentració proteica.	88
2.2. Obtenció de proteïna recombinant.	90
2.2.1. Obtenció de proteïna recombinant a partir d'un cultiu cel·lular.	90
2.2.2. Concentració i purificació de proteïnes recombinants. Cromatografia d'afinitat per IgG lligada a sefarosa.	91
2.3. Assaig de Western-Blot (WB).	93
2.3.1. Electroforesi <i>SDS-PAGE</i> .	93
2.3.2. Transferència.	95
2.3.3. Immunodetecció.	96
2.4. Immunocitoquímica.	98
2.4.1. Metodologia de <i>Cell Surface Binding Assay</i> .	100
2.4.2. Tractament de les dades obtingudes per immunocitoquímica.	101
2.5. Mesura de l'expressió en superfície per citometria de flux.	102
2.6. Mesura de la interacció mitjançant assajos de BIACORE (GE Healthcare).	104
2.7. Mètode de complementació de l'activitat TEV proteasa (Split-TEV).	107
3. CULTIUS CEL·LULARS.	110
3.1. Línies cel·lulars.	110
3.1.1. Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK.	110

3.1.2. Tripsinització.	111
3.1.3. Congelació de cèl·lules.	111
3.1.4. Descongelació de cèl·lules.	111
3.2. Cultius primaris.	112
3.2.1. Obtenció de cultius primaris d'astròcits de rata.	112
3.2.2. Purificació del cultiu d'astròcits.	114
3.2.3. Diferenciació del cultiu d'astròcits.	114
3.3. Transfecció cel·lular.	115
3.3.1. Transfecció transitòria amb fosfat de calci en cèl·lules HeLa i HEK293.	115
3.3.2. Transfecció transitòria amb transfectina o lipofectamina 2000 en cèl·lules HeLa i HEK293.	117
3.3.3. Transfecció transitòria amb lipofectina en astròcits primaris de rata.	118
3.3.4. Determinació de l'eficiència de transfecció per citometria de flux (FACS).	119
3.4. Producció d'adenovirus.	120
3.4.1. Adenovirus.	120
3.4.2. Producció d'adenovirus.	120
3.4.3. Amplificació i producció d'adenovirus.	121
3.4.4. Titulació d'adenovirus.	122
3.4.4.1. Titulació per citometria de flux.	123
3.4.4.2. Titulació pel mètode de l'α-hexon.	124
3.5. Transducció d'astròcits amb adenovirus.	125
3.6. Monitorització del volum cel·lular per fluorescència mitjançant calceïna.	126
3.7. Mesura del flux de sortida cel·lular del D-H ³ -Aspartat.	129
4. TÈCNiques RELACIONADES AMB ELS OÒCITS DE XENOPUS.	132
4.1. Manipulació de les granotes i obtenció d'oòcits.	132
4.2. Microinjecció de cRNA.	134
4.3. Mesura de la permeabilitat osmòtica de l'aigua.	135
5. ANNEX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL.	138
6. ANNEX: CONSTRUCCIONS GENERADES PER BIOLOGIA MOLECULAR.	140

RESULTATS I DISCUSSIÓ. 145

CAPÍTOL 1. DESENVOLUPAMENT DEL MÈTODE SPLIT-TEV PER VALIDAR INTERACIONS ENTRE PROTEÏNES DE MEMBRANA. 147

1. INTRODUCCIÓ. 149
2. IMPLEMENTACIÓ DEL MÈTODE SPLIT-TEV EN EL LABORATORI. 150
3. DEFINICIÓ DE LA PROTEÏNA *CARRIER*. 152
4. PROVA DEL MÈTODE. 154
5. CANVIS EN L'AFINITAT ENZIM-SUBSTRAT. 154
6. DESENVOLUPAMENT DE LA VARIANT DEL MÈTODE QUE NO UTILITZA PROTEÏNA *CARRIER*. 156
7. CANVIS EN L'EXPRESSIÓ DELS COMPONENTS DEL MÈTODE. 157
8. VALIDACIÓ DE LA NOVA VARIANT DEL MÈTODE. 160
9. DISCUSSIÓ. 161

CAPÍTOL 2. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES CANDIDATES A FORMAR PART DE L'INTERACTOMA DE MLC1. 165

1. INTRODUCCIÓ. 167
2. IDENTIFICACIÓ DE CANDIDATS. 167
 - 2.1. Candidats obtinguts mitjançant el sistema *Split-ubiquitin Dualmembrane*. 168
 - 2.2. Candidats obtinguts mitjançant tècniques de proteòmica. 168
3. ESTUDIS DE VALIDACIÓ DELS CANDIDATS. 170
 - 3.1. Validació de la colocalització dels candidats amb MLC1 en cèl·lules. 173
 - 3.2. Validació de la interacció dels candidats amb MLC1 mitjançant Split-TEV. 176
 - 3.3. Validació de GlialCAM i identificació com a segon gen de malaltia. 177
4. DISCUSSIÓ. 179

CAPÍTOL 3. CARACTERITZACIÓ I DESENVOLUPAMENT DE MODELS CEL·LULARS PER L'ESTUDI DE MLC1 I GLIALCAM A NIVELL BIOQUÍMIC I FUNCIONAL. 183

1. INTRODUCCIÓ. 185
 - 1.1. Caracterització del model primari d'astròcits de rata. 185
2. GENERACIÓ DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM. 186
 - 2.1. Desenvolupament del model *knock-down* de MLC1. 186

2.2. Desenvolupament del model <i>knock-down</i> de GlialCAM.	188
3. CARACTERITZACIÓ DELS MODELS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	190
3.1. Estudi de MLC1, GlialCAM i CIC-2 en els models <i>knock-down</i> .	191
3.2. Estudi de marcadors proteics en els models <i>knock-down</i> .	193
4. COMPLEMENTACIÓ DELS MODELS ASTROCITARIS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	194
4.1. Caracterització de l'expressió i la localització de les complementacions del model <i>knock-down</i> de GlialCAM.	195
4.2. Caracterització de la localització de les complementacions del model <i>knock-down</i> de MLC1.	200
5. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS MODELS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	203
6. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS MODELS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	207
6.1. Estudis del mecanisme de regulació dels canvis de volum RVD.	207
6.2. Estudis electrofisiològics dels models <i>knock-down</i> de MLC1 i GlialCAM.	209
6.3. Estudis de la monitorització de la sortida d'osmòlits orgànics durant el procés de recuperació del volum (RVD).	212
7. CARACTERITZACIÓ DE LES VACUOLES ASTROCITÀRIES DELS MODELS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	213
8. ESTUDIS PER IDENTIFICAR LA PUTATIVA FUNCIÓ DE MLC1.	216
9. DISCUSSIÓ.	218
10. ANNEX: FIGURES COMPLEMENTÀRIES DE LA CARACTERITZACIÓ I DESENVOLUPAMENT DELS MODELS CEL·LULARS <i>KNOCK-DOWN</i> DE MLC1 I GLIALCAM.	222
<u>CAPÍTOL 4. ESTUDIS DE LA RELACIÓ ENTRE L'ESTRUCTURA I LA FUNCIÓ DE GLIALCAM.</u>	229
1. INTRODUCCIÓ.	231
2. ESTUDI DE LES DELECCIONS DE GLIALCAM.	232
2.1. Caracterització de l'expressió i localització de les deleccions de GlialCAM.	233
2.2. Caracterització de la interacció de les deleccions de GlialCAM.	234
2.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les deleccions de GlialCAM.	235

2.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les deleccions de GlialCAM.	238
2.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les deleccions de GlialCAM.	239
3. ESTUDIS DE LES PROTEÏNES QUIMÈRIQUES GLIALCAM-TAC.	239
3.1. Caracterització de l'expressió i localització de les quimeres GlialCAM-TAC.	241
3.2. Caracterització de la interacció de les quimeres GlialCAM-TAC.	242
3.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les quimeres GlialCAM-TAC.	243
3.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-TAC.	246
3.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-TAC.	246
4. ESTUDIS DE LES PROTEÏNES QUIMÈRIQUES GLIALCAM-HEPACAM2.	247
4.1. Caracterització de l'expressió i localització de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.	249
4.2. Caracterització de la interacció de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.	251
4.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.	252
4.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.	255
4.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.	255
5. ESTUDIS PER IDENTIFICAR ELS DOMINIS DE GLIALCAM IMPLICATS EN LA LOCALITZACIÓ A LES UNIONS CEL·LULARS.	256
6. ESTUDIS PER IDENTIFICAR ELS AMINOÀCIDS INVOLUCRATS EN ELS CANVIS FUNCIONALS DE CIC-2 PER PART DE GLIALCAM.	258
7. ESTUDIS DE LA INTERACCIÓ EN <i>TRANS</i> DE GLIALCAM.	260
7.1. Realització d'un anticòs quimèric amb el domini extracel·lular de GlialCAM.	260
7.2. Estudi de la interacció en <i>trans</i> de GlialCAM mitjançant la metodologia de <i>Cell Surface Binding Assay</i> .	262
7.3. Estudi de la interacció en <i>trans</i> de GlialCAM mitjançant la mesura d'expressió en superfície per citometria de flux.	263
7.4. Estudi de la interacció en <i>trans</i> de GlialCAM mitjançant assajos de BIACORE.	265
8. DISCUSSIÓ.	267

DISCUSSIÓ GENERAL.	271
CONCLUSIONS.	277
BIBLIOGRAFIA.	281
ANNEX: ARTICLES PUBLICATS.	299

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ.

- Figura 1. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC i a un control. (pàgina 7)
- Figura 2. Microfotografies que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca d'un pacient de MLC. (pàgina 8)
- Figura 3. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC amb fenotip benigne. (pàgina 9)
- Taula 1. Mutacions identificades en el gen *MLC1* en pacients de MLC. (pàgina 11)
- Taula 2. Mutacions identificades en el gen *GLIALCAM* en pacients de MLC. (pàgina 12)
- Figura 4. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1 humana, segons prediccions bioinformàtiques. (pàgina 13).
- Figura 5. Localització de MLC1 a nivell de microscopia electrònica. (pàgina 14)
- Figura 6. Imatge de microscopia electrònica del cervell d'un pacient de MLC. (pàgina 16)
- Figura 7. Estudis de tràfic a la membrana plasmàtica per part de variants mutants de MLC1. (pàgina 17)
- Figura 8. Esquema de l'estructura secundària de GlialCAM. (pàgina 18)
- Figura 9. Imatge de microscopia electrònica d'una mostra de teixit cerebral humà. (pàgina 19)
- Figura 10. Canvis en la localització subcel·lular de MLC1 per part de GlialCAM en cèl·lules HeLa. (pàgina 21)
- Figura 11. Avaluació de la purificació per afinitat de GlialCAM en extractes de cervell de ratolí. (pàgina 21)
- Figura 12. Canvis en la localització subcel·lular de CIC-2 per part de GlialCAM en cèl·lules HeLa. (pàgina 22)
- Figura 13. Canvis en l'activitat del canal CIC-2 provocats per GlialCAM en cèl·lules HEK. (pàgina 22)
- Figura 14. Representació esquemàtica dels dominis de GlialCAM i la posició de les mutacions *missense*. (pàgina 23)
- Figura 15. Model esquemàtic del mecanisme molecular involucrat en la resposta als canvis de volum. (pàgina 29)
- Figura 16. Esquemes dels mecanismes de control dels canvis de volum cel·lular en astròcits. (pàgina 31)

- Figura 17. Nomenclatura d'unions *gap*. (pàgina 35)
- Figura 18. Resum dels mecanismes astroglials implicats en l'homeòstasi extracel·lular. (pàgina 37)
- Figura 19. Esquema del sistema clàssic de Y2H. (pàgina 42)
- Figura 20. Exemples de mètodes basats en la complementació de proteïnes (PCA). (pàgina 44)
- Figura 21. Sistema de doble híbrid de membrana (MYTH). (pàgina 45)
- Figura 22. Exemples de mètodes basats en la transferència d'energia. (pàgina 46)
- Figura 23. Esquema de l'aplicació del mètode BioID. (pàgina 48)
- Figura 24. Esquema del mètode de PLA per reconèixer una proteïna. (pàgina 49)
- Figura 25. Codificació d'informació quantitativa de proteomes sencers amb SILAC. (pàgina 51)
- Figura 26. Exemples de microarrays de proteïnes. (pàgina 53)
- Figura 27. Representació del fenomen SPR. (pàgina 54)

MATERIALS I MÈTODES.

- Figura 28. Esquema gràfic del mètode de mutagènesi per PCR recombinant. (pàgina 72)
- Figura 29. Flexibilitat del sistema de recombinació *Gateway*. (pàgina 76)
- Figura 30. Esquema de la reacció de recombinació *Gateway Multisite* de 2 fragments. (pàgina 79)
- Figura 31. Via de la biogènesi dels miRNA en cèl·lules eucariotes. (pàgina 81)
- Figura 32. Càlcul del valor R per identificar localització en unions intracel·lulars. (pàgina 102)
- Figura 33. Esquema del fenomen SPR. (pàgina 104)
- Figura 34. Sensograma obtingut en un assaig de BIACORE. (pàgina 105)
- Figura 35. Esquema representatiu del mètode Split-TEV. (pàgina 108)
- Taula 3. Adenovirus. (pàgina 125)
- Figura 36. Oòcits de *Xenopus laevis* aïllats i classificats. (pàgina 134)

RESULTATS I DISCUSSIÓ.

Capítol 1

- Figura 37. Esquema de les possibles variants del mètode Split-TEV per proteïnes de membrana. (pàgina 150)

Figura 38. Esquema del funcionament del mètode de detecció de la senyal. (pàgina 151)

Figura 39. Prova de *carriers*. (pàgina 153)

Figura 40. Implementació del mètode Split-TEV. (pàgina 154)

Figura 41. Comparativa entre els substrats d'alta i baixa afinitat. (pàgina 155)

Figura 42. Utilització d'un enzim TEV de baixa afinitat. (pàgina 156)

Figura 43. Desenvolupament del mètode sense proteïna *carrier*. (pàgina 157)

Figura 44. Nivells baixos d'expressió dels components del mètode Split-TEV. (pàgina 158)

Figura 45. Variant final del nou mètode Split-TEV. (pàgina 159)

Figura 46. Validació de la nova variant del mètode Split-TEV per diferents proteïnes de membrana. (pàgina 161)

Capítol 2

Taula 4. Descripció dels resultats obtinguts per estudis de proteòmica. (pàgina 169)

Figura 47. Expressió i localització de les proteïnes candidates GLT1, NBC, TRPC4 i TTYH1 amb els epítops Flag i HA fusionats a l'extrem C-terminal. (pàgina 174)

Figura 48. Colocalització de les proteïnes candidates GLT1, NBC, TRPC4 i TTYH1 amb MLC1 en astròcits primaris de rata. (pàgina 175)

Figura 49. Validació de la interacció entre MLC1 i GLT-1 i de la interacció entre MLC1 i NBC per Split-TEV. (pàgina 177)

Figura 50. Colocalització de GlialCAM amb MLC1 en astròcits primaris de rata. (pàgina 178)

Figura 51. Validació de la interacció entre MLC1 i GlialCAM per Split-TEV. (pàgina 178)

Figura 52. Avaluació de les diferents purificacions per afinitat amb els anticossos contra MLC1 realitzades per *Logopharm*. (pàgina 179)

Capítol 3

Figura 53. Desenvolupament del model *knock-down* de MLC1 mitjançant miRNA en cultius primaris d'astròcits de rata. (pàgina 187)

Figura 54. Anàlisi de la reducció de l'expressió de GlialCAM en cultius primaris d'astròcits de rata, utilitzant els miRNAs. (pàgina 188)

Figura 55. Caracterització del model *knock-down* de GlialCAM en cultius primaris d'astròcits de rata, utilitzant els miRNAs. (pàgina 190)

Figura 56. Estudi de GlialCAM i CIC-2 en el model *knock-down* de MLC1. (pàgina 191)

- Figura 57. Estudi de MLC1 i CIC-2 en el model *knock-down* de GlialCAM. (pàgina 192)
- Figura 58. Estudi de marcadors proteics en els models *knock-down*. (pàgina 194)
- Figura 59. Caracterització dels nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en els models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM per miRNA GlialCAM1. (pàgina 196)
- Figura 60. Estudi de la localització de les proteïnes sobreexpressades en les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM. (pàgina 198)
- Figura 61. Estudi de la localització de MLC1 en astròcits dels models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM. (pàgina 199)
- Figura 62. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 en les complementacions del model *knock-down* de MLC1. (pàgina 201)
- Figura 63. Estudi de la localització dels mutants de MLC1 en el model astrocitari. (pàgina 202)
- Figura 64. Caracterització fenotípica dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. (pàgina 204)
- Figura 65. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de MLC1. (pàgina 205)
- Figura 66. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM. (pàgina 206)
- Figura 67. Assaig de mesura dels canvis de volum mitjançant calceïna. (pàgina 208)
- Figura 68. Mesura de l'activitat CIC-2 en astròcits dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. (pàgina 210)
- Figura 69. Mesura de l'activitat VRAC en astròcits dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. (pàgina 211)
- Figura 70. Mesura de l'activitat VRAC en astròcits dels models de sobreexpressió. (pàgina 212)
- Figura 71. Assaig de mesura del flux de sortida d'aspartat radioactiu H³-D-Aspartat. (pàgina 213)
- Figura 72. Caracterització de les vacuoles astrocitàries. (pàgina 214)
- Figura 73. Localització de MLC1 en astròcits tractats amb inhibidors. (pàgina 216)
- Figura 74. Càlcul de la permeabilitat osmòtica a l'aigua en oòcits de *Xenopus laevis*. (pàgina 218)
- Figura 75. Representació esquemàtica de les possibles funcions de MLC1 i GlialCAM a les cèl·lules astrocitàries. (pàgina 220)

Figura 76. Caracterització dels nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en els models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM per miRNA GlialCAM₂. (pàgina 222)

Figura 77. Estudi de localització en les complementacions del model en astròcits infectats amb miRNA SCR. (pàgina 223)

Figura 78. Estudi de localització de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM generat amb el miRNA GlialCAM₂. (pàgina 224)

Figura 79. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 en astròcits infectats amb miRNA SCR i utilitzant les condicions de complementació que s'utilitzaran amb el model *knock-down* de MLC1. (pàgina 225)

Figura 80. Estudi de la localització dels mutants de MLC1 en el model astrocitari *knock-down* de MLC1. (pàgina 226)

Figura 81. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM pel miRNA GlialCAM₂. (pàgina 227)

Capítol 4

Figura 82. Representació esquemàtica de les delecions de GlialCAM. (pàgina 233)

Figura 83. Caracterització dels nivells d'expressió de les delecions de GlialCAM. (pàgina 233)

Figura 84. Localització de les delecions de GlialCAM. (pàgina 234)

Figura 85. Estudis d'interacció de les delecions de GlialCAM. (pàgina 235)

Figura 86. Colocalització de MLC1 i les delecions de GlialCAM. (pàgina 236)

Figura 87. Colocalització de CIC-2 i les delecions de GlialCAM. (237)

Figura 88. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les delecions de GlialCAM. (pàgina 238)

Figura 89. Esquema representatiu dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. (pàgina 239)

Figura 90. Representació esquemàtica de les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 241)

Figura 91. Caracterització dels nivells d'expressió de les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 241)

Figura 92. Localització de les quimeres GlialCAM-TAC en cèl·lules HeLa. (pàgina 242)

Figura 93. Estudis d'interacció de les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 243)

Figura 94. Colocalització de MLC1 i les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 244)

Figura 95. Colocalització de CIC-2 i les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 245)

Figura 96. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les quimeres GlialCAM-TAC. (pàgina 246)

- Figura 97. Esquema representatiu dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. (pàgina 247)
- Figura 98. Representació esquemàtica de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 249)
- Figura 99. Caracterització dels nivells d'expressió de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 249)
- Figura 100. Localització de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 en cèl·lules HeLa. (pàgina 250)
- Figura 101. Estudis d'interacció de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 251)
- Figura 102. Colocalització de MLC1 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 253)
- Figura 103. Colocalització de CIC-2 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 254)
- Figura 104. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. (pàgina 255)
- Figura 105. Esquema representatiu dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. (pàgina 256)
- Figura 106. Estudis bioquímics amb CD4 i CD4cc. (pàgina 258)
- Figura 107. Estudis electrofisiològics dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats pel domini transmembrana de GlialCAM mitjançant la mutació dels seus aminoàcids a Alanina. (pàgina 259)
- Figura 108. Esquema representatiu de l'anticòs quimèric construït. (pàgina 261)
- Figura 109. Producció, concentració i purificació de la proteïna GlialCAM Ext Fc. (pàgina 261)
- Figura 110. Assaig de *Cell Surface Binding* per detectar interacció *trans* de GlialCAM. (pàgina 262)
- Figura 111. Assaig de mesura de l'expressió en superfície per citometria de flux. (pàgina 264)
- Figura 112. Assaig de BIACORE per validar la interacció *trans* de GlialCAM. (pàgina 266)
- Figura 113. Esquema representatiu dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. (pàgina 268)
- Figura 114. Possible model d'estructura-funció dels diferents dominis de GlialCAM. (pàgina 270)

INTRODUCCIÓ

L'objectiu de la present Tesi és avançar en el coneixement de la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals. Aquesta malaltia és un tipus de leucodistròfia neurodegenerativa que afecta la mielina. En la introducció, primer es descriu de forma general, el context on es desenvolupa la malaltia, la classificació de les leucodistròfies i s'aprofundeix en els aspectes clínics i moleculars de la nostra malaltia d'estudi. En segon lloc, es descriu el paper dels astròcits en el sistema nerviós central, ja que són les cèl·lules on s'expressen majoritàriament les proteïnes estudiades i on s'han realitzat gran part dels experiments. Per últim, es tracta alguns dels diferents mètodes utilitzats en la identificació d'interaccions entre proteïnes.

1. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC), UN EXEMPLE DE LEUCODISTRÒFIA.

El sistema nerviós dirigeix un gran ventall de processos, com el funcionament dels òrgans interns, la memòria, el pensament, l'aprenentatge, i els processos voluntaris i involuntaris de l'organisme. El sistema nerviós es classifica, de manera simplificada, en: el Sistema Nerviós Central (SNC), constituït per l'encèfal i la medul·la espinal; i el Sistema Nerviós Perifèric (SNP), format pels nervis cranials i pels nervis perifèrics que surten de la medul·la i les seves ramificacions.

Tot el teixit nerviós, tant el central com el perifèric, està format majoritàriament per dues classes de cèl·lules: les neurones i les cèl·lules glials. La glia es pot dividir en dos tipus: la microglia i la macroglia. La macroglia està formada majoritàriament per astròcits i també per cèl·lules endodurals i oligodendròcits.

Els oligodendròcits són cèl·lules amb un cos petit i condensat i unes prolongacions llargues i ramificades. La funció principal dels oligodendròcits és la formació de la mielina, que recobreix els axons neuronals.

La mielina consisteix en una estructura espiral formada per la prolongació de la membrana plasmàtica dels oligodendròcits en el SNC, i de les cèl·lules de Schwann en el SNP. La superposició de la membrana plasmàtica, que rodeja l'axó, forma una estructura periòdica de capes concèntriques alternades. Aquestes capes són electrodenses (membranes fusionades), i clares o línies interperiòdiques (fusió de

l'espai extracel·lular), les quals formen una estructura laminar compacta que configura l'envolta de mielina madura.

Cada beina de mielina es troba situada al llarg dels axons en segments anomenats internodes, els quals confereixen aïllament elèctric a l'axó. Els espais no mielinitzats entre internodes s'anomenen Nòduls de Ranvier, on hi ha una elevada densitat de canals i transportadors iònics que generen els potencials d'acció fent que aquests saltin d'un node a l'altre. Aquest procés, anomenat conducció saltatòria, permet que la transmissió del impuls nerviós sigui ràpida i amb una mínima despesa d'energia. A part de la transmissió del impuls nerviós també s'implica a la mielina en el desenvolupament i el manteniment de l'axó, així com la inhibició del creixement axonal i la seva regeneració.

Els axons mielinitzats conformen la substància blanca, la qual ocupa més de la meitat del cervell humà. S'ha observat que tant les mutacions en els gens relacionats amb la mielina, com els canvis en l'estructura de la substància blanca, causen una gran varietat de desordres neurològics i psiquiàtrics. La mielina pot ser danyada per malalties autoimmunes (com el cas de l'esclerosi múltiple), per desordres d'origen ambiental (com els causats per l'exposició a dissolvents orgànics) o per malalties genètiques. Entre les malalties genètiques destaquen les leucodistròfies.

La paraula leucodistròfia prové de les arrels gregues "*leuco*" (blanc), "*dis*" (discapacitat) i "*trophos*" (creixement); per tant, les leucodistròfies agrupen un conjunt de trastorns genètics del sistema nerviós on la generació, el desenvolupament i/o el manteniment de la mielina es veuen afectats. Les leucodistròfies que impliquen el sistema nerviós central es denominen leucoencefalopaties.

1.1. CLASSIFICACIÓ DE LES LEUCOENCEFALOPATIES.

Si es segueix un criteri patològic, es poden distingir 3 tipus de leucoencefalopaties:

- Desmielinitzants, en les que ocorre una degradació de la mielina i un defecte en la seva estructura, degut generalment a l'acumulació de compostos lipídics que resulten tòxics pels oligodendròcits. Patologies representatives d'aquest grup són l'Adrenoleucodistròfia, la Malaltia de Krabe o la Leucodistròfia Metacromàtica.
- Hipomielinitzants, on el defecte es produeix degut a una baixa producció de mielina, degut normalment a una disfunció proteica que provoca una deficient compactació de la mielina. Aquí destaquen la malaltia de Pelizaeus-Merzbacher, la malaltia

d'Alexander, la leucoencefalopatia anomenada *Vanishing white matter* (VWM) i la deficiència en MBP, entre altres.

- Espongiformes, caracteritzades per una degeneració quística de la mielina, ja que estan afectades principalment les vies implicades en el control del volum cel·lular. Dos exemples típics d'aquest tipus de leucodistròfies són la malaltia de Canavan i la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC).

Si es segueix un criteri bioquímic, les leucoencefalopaties es poden agrupar en funció dels gens alterats:

- *Trastorns lipídics*: Adrenoleucodistròfia, Malaltia de Krabe, Leucodistròfia Metacromàtica, Síndrome Sjögren-Larsson o Xantomatosi cerebrotendinosa.
- *Trastorns de les proteïnes de la mielina*: Pelizaeus-Merzbacher, deficiència en MBP.
- *Trastorns relacionats amb àcids orgànics*: Malaltia de Canavan.
- *Trastorns en el metabolisme energètic*: MELAS, Leber, Complex I i III, Citocrom oxidasa.
- *Altres causes*: CADASIL, deficiència en la merosina.
- *Causas desconegudes*: Malaltia d'Alexander, *Vanishing white matter*, MLC.

En humans, la mielinització es produeix durant els primers dos anys de vida però el procés no és completat totalment fins a l'adolescència. Per aquest motiu, les leucodistròfies apareixen majoritàriament en la infantesa. La formació de la mielina i el seu manteniment requereix el funcionament conjunt dels oligodendròcits, els astròcits i les neurones. Els astròcits s'han relacionat amb el manteniment de la substància blanca (Liedtke et al., 1996) i estan afectats directament en algunes leucodistròfies com la leucoencefalopatia VWM, la malaltia d'Alexander (Sen and Levison, 2006) i la MLC.

1.2. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC).

L'any 1991, un neuròleg de Bombai va presentar les característiques clíniques d'un determinat nombre de pacients locals pertanyents a un grup determinat del nord de la Índia, coneguts com els Agarwals. Aquests pacients mostraven signes de macrocefàlia, un lleuger retard mental i espasticitat progressiva. No es van trobar anomalies metabòliques però els estudis de neuroimatge mostraven signes clars d'un trastorn de la substància blanca, amb la característica presència de quists a nivell subcortical. Degut al tipus de transmissió genètica, es va proposar que la malaltia presentava una herència autosòmica recessiva.

Des del seu descobriment, la malaltia va adoptar diferents nomenclatures, fins que la major part d'investigadors implicats en el camp van consensuar la denominació de MLC com acrònim per la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals.

1.2.1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DE LA MALALTIA.

A partir de l'any 1995, diferents investigadors (Van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b; Singhal et al., 1996; Topcu et al., 1998) van proposar un quadre clínic característic corresponent a MLC, basat en aspectes clínics i en l'anàlisi de neuroimatge (MRI). Per tant, la identificació de la malaltia es basa en les següents característiques:

1. Macrocefalia als primers anys de vida. Posteriorment, el creixement del cap resulta generalment normal, arribant a una línia paral·lela al percentil 98.
2. Desenvolupament inicial dels pacients sense alteracions, tant a nivell cognitiu com motor. Durant els primers estadis de desenvolupament, els pacients mostren autonomia per caminar.
3. Deteriorament de les funcions motores i atàxia cerebelar juntament amb espasticitat durant la infància més tardana i l'adolescència. La capacitat per caminar és limitada i inestable, amb caigudes freqüents. La majoria dels pacients acaben necessitant cadira de rodes.
4. Lleuger retard mental que pot passar desapercebut degut a una capacitat de comunicació i sociabilitat relativament normals en els primers anys de vida. Posteriorment resulta més evident i fins i tot es pot presentar autisme.
5. Anomalies a nivell del moviment extrapiramidal, incloent distonia i atenosi, en períodes més tardans.
6. La majoria de pacients presenten episodis epilèptics controlats amb relativa facilitat (Yalçinkaya et al., 2003).
7. Deteriorament eventual degut a la manifestació d'un trauma craneoencefàlic, provocant episodis epilèptics, períodes d'inconsciència prolongada que poden desencadenar en un estat de coma (Bugiani et al., 2003) o deteriorament motor agut que augmenta gradualment.

Encara que la malaltia MLC presenta un patró fenotípic característic, existeix una gran variabilitat en les manifestacions clíniques entre els diferents pacients, fins i tot entre els membres d'una mateixa família. Així, alguns pacients perden la capacitat de caminar a edats primerenques, mentre que altres la conserven fins a una major edat. Alguns presenten retard mental agut mentre que altres aconsegueixen acabar estudis superiors. També varia l'esperança de vida, mentre que uns pacients moren a

l'adolescència, d'altres arriben als 40 anys. Aquesta heterogeneïtat clínica indica que existeixen factors genètics i/o ambientals que influeixen en la severitat de la malaltia (Blattner et al., 2003).

Estudis basats en neuroimatge mitjançant tècniques de MRI, mostren un patró característic pels pacients de MLC que els diferencia de les altres leucodistrofies (Van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b; Singhal et al., 1996; Topcu et al., 1998). Els criteris basats en MRI són els següents:

1. Encèfal atrofiat i inflat que mostra una substància blanca anormalment difusa (**Figura 1**).
2. A les estructures centrals com el cos callós, la càpsula interna i el tronc cerebral, la substància blanca es troba més conservada. També s'observa aquesta preservació a les regions subcorticals i periventriculars de la zona occipital del cervell.
3. La substància blanca del cerebel sol presentar una senyal lleugerament anormal, encara que el seu volum és normal.
4. Presència de quists subcorticals a la regió anterior-temporal i freqüentment també a la regió fronto-parietal (**Figura 1 A, fletxes**).
5. Al llarg del desenvolupament de la malaltia, el volum desmesurat de la substància blanca disminueix, mentre que l'atròfia cerebral continua. A més a més, el nombre i la mida dels quists sol augmentar amb el temps.

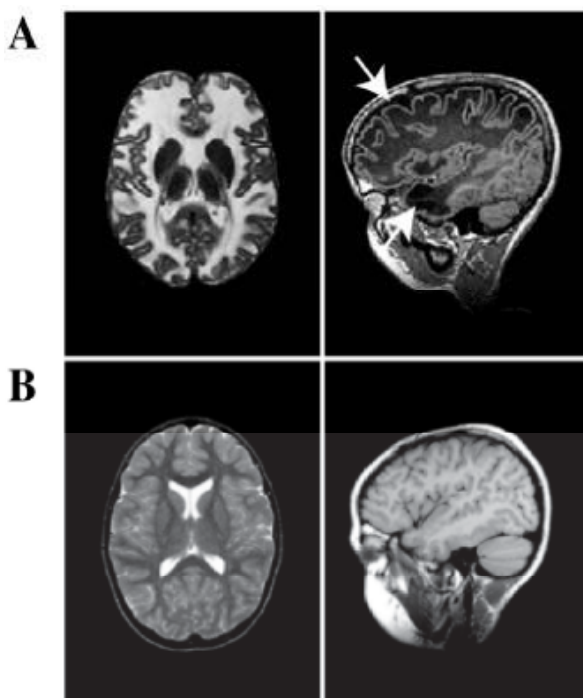


Figura 1. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC i a un control. **A.** MRI corresponent a un pacient de MLC, en el que s'observa una substància blanca anormalment difusa i la presència de quists a nivell fronto-parietal i anterior-temporal (fletxes). **B.** MRI corresponent a un nen no afectat per la malaltia. (Esquerra, vistes axials; dreta, vistes sagitals).

Mitjançant l'anàlisi utilitzant tècniques d'espectroscòpia per ressonància magnètica de protons s'ha observat una disminució en la concentració de la majoria de metabòlits en els pacients amb MLC. Això suggereix que hi ha un augment en el contingut d'aigua en el cervell (Brockmann et al., 2003; Sener, 2003a, 2003b). Mitjançant imatges de FLAIR també s'ha suggerit l'alt contingut d'aigua en la substància blanca dels pacients (De Stefano et al., 2001).

Des del punt de vista fisiopatològic, a partir d'una biòpsia obtinguda d'un pacient de MLC (Van der Knaap et al., 1996), s'observa un fenotip de degeneració espongiforme de la substància blanca. La biòpsia mostra la presència de nombroses vacuoles situades en les làmines més externes de la mielina. No obstant, a nivell de les capes més interiors no s'observa la presència de cap d'aquestes vacuoles (**Figura 2**). La majoria de vacuoles es troben envoltades per una única membrana de mielina, encara que algunes es poden trobar rodejades per estructures multilaminars de mielina o per prolongacions cel·lulars corresponents a oligodendròcits. El fet que les vacuoles només es formen a les capes més externes de la mielina fa pensar que no es compromet en excés la transmissió del impuls nerviós, fet que podria explicar que el fenotip clínic de la malaltia sigui progressiu i no mortal durant els primers anys de vida.

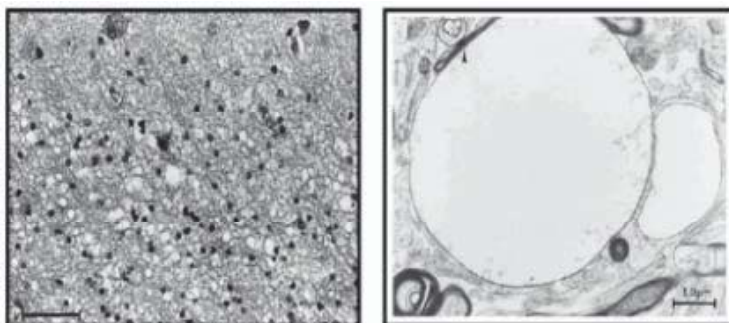


Figura 2. Microfotografies que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca d'un pacient de MLC. A la dreta s'observa un detall d'una gran vacuola en les làmines de la mielina. Imatge extreta de (Van der Knaap et al., 1996).

Existeix però, un percentatge de pacients que presenten unes característiques fenotípiques diferents. Tot i presentar un quadre clínic de MLC als primers anys de vida, milloren i/o perden els signes de deteriorament amb el pas dels anys. S'observa macrocefàlia als primers anys de vida però el desenvolupament és normal o amb un mínim retard i per tant, les funcions motores són normals i no mostren espasticitat ni atàxia. Els pacients no presenten retard mental o en tot cas de grau baix on es necessita educació especial i en un 50% d'aquests pacients amb dèficit cognitiu s'observen símptomes d'autisme (Van der Knaap et al., 2010; López-Hernández et al., 2011a). En les imatges de MRI s'observa que la substància blanca del cervell i del

cerebel presenta menors anormalitats en els estadis inicials i evoluciona al llarg del temps a imatges de la substància blanca típicament normals. A més a més, els quists subcorticals únicament s'observen a la regió anterior-temporal i disminueixen de mida o desapareixen amb el temps (**Figura 3**). Aquest tipus de fenotip on es reverteixen els signes de deteriorament s'ha anomenat fenotip benigne.

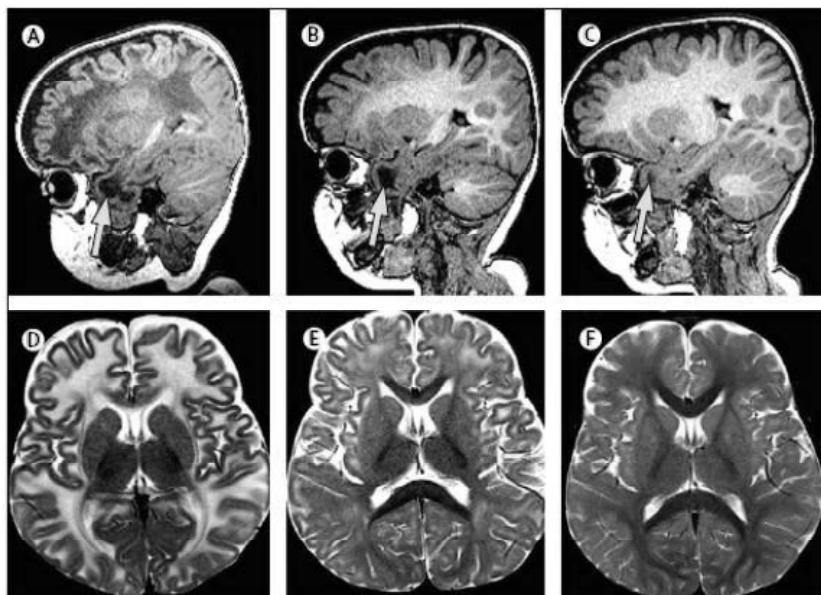


Figura 3. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC amb fenotip benigne. MRI corresponent a un pacient de MLC amb fenotip benigne a les edats de 9 mesos (**A i D**), 18 mesos (**B i E**) i 42 mesos (**C i F**). En **A i D** s'observen les característiques típiques de MLC, en canvi en **B-E i C-F** s'observa una millora en la substància blanca i la disminució de la mida dels quists subcorticals a la regió anterior-temporal (fletxes). (A, B, i C, vistes sagitals; D, E i F, vistes axials). Imatge extreta de (Van der Knaap et al., 2012).

Així doncs, els pacients es classifiquen segons tinguin un fenotip clàssic o benigne. El fenotip clàssic s'ha anomenat MLC1 o MLC2A en funció del tipus de gen afectat (veure apartat 1.2.2.) i presenta les característiques clíniques típiques de MLC. El fenotip benigne on remeten les característiques clíniques amb el temps, s'ha anomenat MLC2B.

Epidemiològicament parlant, MLC és una malaltia extremadament rara. No s'han realitzat estudis per obtenir-ne la incidència. Es coneix que la màxima incidència s'ha observat en la població turca (Yiş et al. 2010) i en la comunitat Agrawal (Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 1996). Com altres malalties de baixa freqüència, la consanguinitat i l'endogàmia són factors que contribueixen en augmentar la incidència de MLC.

1.2.2. GENÈTICA.

A partir d'estudis de lligament amb famílies corresponents a una població turca es va trobar un *locus* per MLC en el cromosoma 22qtel (Topçu et al., 2000). En un estudi posterior, la regió crítica implicada en la malaltia es va reduir gràcies a marcadors microsatèl·lits i recombinants. Els gens candidats localitzats a la regió crítica van ser seqüenciats en els pacients analitzats, observant mutacions en un gen denominat *KIAA0027* o *WKL1* [MIM 604004] que va ser renombrat com *MLC1* ja que es tractava del primer gen implicat en MLC (Leegwater et al., 2001).

El gen *MLC1* conté 12 exons amb el codó d'inici a l'exó 2 i una regió no codificant a l'extrem 3' de 2.2 kb. S'han descrit dos trànscrips alternatius (NM_015166.3 i NM_139292.2) que difereixen a nivell de la regió 5' corresponent al primer exó, però que resulten en un mateix mRNA i codifiquen per la proteïna MLC1 de 377 aminoàcids.

Fins al moment hi ha descrites 77 mutacions diferents en el gen *MLC1* (**Taula 1**). D'aquestes mutacions, 39 són *missense*, 16 són mutacions d'*splicing*, 14 són delecions, 5 són duplicacions, 2 són inserció+deleció i 1 és *nonsense* (Van der Knaap et al., 2012). Estan repartides per tot el gen i s'han trobat tant en homozigosi com en heterozigosi.

S'ha observat un efecte fundador pel gen *MLC1* en varies poblacions. Entre la població d'Agarwals de la Índia, pràcticament la totalitat de casos documentats presenten homozigosi per la inserció c.135dupC, que causa un codó stop prematur a la proteïna (Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 2003). Un altre exemple és la mutació puntual c.176G>A, que causa la mutació G59E a la proteïna i és comuna en la població jueva de Líbia (Ben-Zeev et al., 2002). Finalment la mutació c.278C>T que correspon al canvi proteic S93L, s'ha trobat en varis pacients del Japó (Saijo et al., 2003; Tsujino et al., 2003).

La variabilitat fenotípica intrafamiliar observada en pacients que porten la mateixa mutació en *MLC1*, indica que hi ha factors genètics i ambientals que influeixen en la severitat de la malaltia (Pascual-Castroviejo et al. 2005). Per tant, no s'ha pogut trobar una correlació genotip-fenotip (Leegwater et al., 2002), ja que la severitat del fenotip dels pacients no correlaciona amb les mutacions trobades.

Zona	Tipus de mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna	Zona	Tipus de mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna
Exó 2	Deleció	c.109delC	p.Leu37CysfsX21	Exó 5	Missense	c.373T>C	p.Cys125Arg
Exó 2	Deleció	c.136delT	p.Cys46AlafsX12	Exó 5	Missense	c.388G>A	p.Gly130Arg
Exó 4	Deleció	c.268_422del	p.Cys90_Gln377delins38	Exó 5	Missense	c.422A>G	p.Asn141Ser
Exó 4, 5	Deleció	c.299_423+108del	p.Val100AspfsX39	Exó 5	Missense	c.423C>A	p.Asn141Lys
Exó 5	Deleció	c.324delT	p.Asn110ThrfsX12	Exó 6	Missense	c.470C>A	p.Ala157Glu
Exó 6	Deleció	c.449_455del	p.Leu150ArgfsX9	Exó 8	Missense	c.604G>A	p.Glu202Lys
Exó 6	Deleció	c.514_515delAA	p.Lys172GlufsX8	Exó 8	Missense	c.629T>A	p.Val210Asp
Exó 7	Deleció	c.594_597delCTCA	p.Tyr198X	Exó 8	Missense	c.634G>A	p.Gly212Arg
Exó 7	Deleció	c.597_597+33del	p.Val200SerfsX4	Exó 8	Missense	c.635G>A	p.Gly212Glu
Exó 10	Deleció	c.793delA	p.Ser265AlafsX20	Exó 9	Missense	c.733G>C	p.Ala245Pro
Exó 10	Deleció	c.849delC	p.Met284X	Exó 9	Missense	c.736A>C	p.Ser246Arg
Exó 11	Deleció	c.907_930del	p.Leu307_Leu314del	Exó 10	Missense	c.806C>A	p.Ser269Tyr
Exó 11	Deleció	c.921_926del	p.Leu309_Leu310del	Exó 10	Missense	c.809C>G	p.Pro270Arg
Exó 11.12	Deleció	c.1059+567_*2192+?del	p.?	Exó 10	Missense	c.821C>T	p.Thr274Ile
Exó 2	Duplicació	c.111_112dupGC	p.Gln38ArgfsX21	Exó 10	Missense	c.823G>A	p.Ala275Thr
Exó 2	Duplicació	c.135dupC	p.Cys46LeufsX34	Exó 10	Missense	c.824C>A	p.Ala275Asp
Exó 5	Duplicació	c.357dupT	p.Ala120CysfsX61	Exó 10	Missense	c.832T>C	p.Tyr278His
Exó 6	Duplicació	c.456_460dupGGAGC	p.Leu154ArgfsX9	Exó 10	Missense	c.839C>T	p.Ser280Leu
Exó 11	Duplicació	c.927-929dupGCT	p.Leu310dup	Exó 10	Missense	c.880C>T	p.Pro294Ser
Exó 5	Inserció+deleció	c.337_353delinsG	p.Ile113GlyfsX4	Exó 11	Missense	c.959C>A	p.Thr320Lys
Exó 11	Inserció+deleció	c.908-918delinsGCA	p.Val303GlyfsX96	Exó 11	Missense	c.976T>C	p.Cys326Arg
Exó 2	Missense	c.65G>A	p.Arg22Gln	Exó 3	Nonsense	c.213C>G	p.Tyr71X
Exó 2	Missense	c.95C>T	p.Ala32Val	Exó 2	Deleció	c.177+1delG	p?
Exó 2	Missense	c.176G>A	p.Gly59Glu	Intró 5	Duplicació	c.423+2dup	p.?
Exó 3	Missense	c.206C>T	p.Ser69Leu	Intró 2	Substitució	c.178-10T>A	p.?
Exó 3	Missense	c.218G>A	p.Gly73Glu	Intró 5	Substitució	c.423+6T>C	p.?
Exó 3	Missense	c.235G>A	p.Glu79Lys	Intró 2	Splicing	c.177+1G>T	p.?
Exó 3	Missense	c.238A>G	p.Met80Val	Intró 3	Splicing	c.267+1G>C	p.?
Exó 3	Missense	c.240G>A	p.Met80Ile	Intró 3	Splicing	c.268+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.249G>T	p.Leu83Phe	Intró 4	Splicing	c.322-1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.250C>T	p.Arg84Cys	Intró 4	Splicing	c.322-2A>G	p.?
Exó 3	Missense	c.251G>A	p.Arg84His	Intró 5	Splicing	c.423+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.255T>G	p.Cys85Trp	Intró 7	Splicing	c.597+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.263G>T	p.Gly88Val	Intró 8	Splicing	c.714+1G>A	p.?
Exó 4	Missense	c.274C>T	p.Pro92Ser	Intró 9	Splicing	c.772-1G>C	p.?
Exó 4	Missense	c.278C>T	p.Ser93Leu	Intró 10	Splicing	c.895-1G>C	p.?
Exó 5	Missense	c.353C>G	p.Thr118Arg	Intró 10	Splicing	c.895-2A>G	p.?
Exó 5	Missense	c.353C>T	p.Thr118Met	Intró 10	Splicing	c.895-226T>G	p.?
Exó 5	Missense	c.359C>T	p.Ala120Val	Intró 11	Splicing	c.1060-2A>G	p.?

Taula 1. Mutacions identificades en el gen *MLC1* en pacients de MLC. (fs: canvi de la pauta de lectura). Taula adaptada de (Van der Knaap et al., 2012).

Les mutacions en *MLC1* es van trobar a un 70-80% dels pacients de MLC (P. A. J. Leegwater et al. 2002; J. Wang et al. 2011; Yüzbaşıoğlu et al. 2011). Per tant, existien pacients que manifestaven les característiques clíniques de MLC i no presentaven mutacions en *MLC1* ni lligament amb el seu *locus* (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003). Aquest fet indicava que hi havia com a mínim un altre gen implicat en la malaltia.

Estudis en varis laboratoris no van poder identificar cap altre gen responsable de la malaltia. A més a més, es va descriure que els pacients que no presentaven mutacions en *MLC1* mostraven dos tipus de fenotips diferents (*MLC2A* i *MLC2B*). Aquests fets indicaven una alta heterogeneïtat genètica.

Per poder evitar el problema de l'heterogeneïtat genètica, el nostre grup va realitzar una aproximació proteòmica per identificar proteïnes que interaccionessin amb MLC1. Es va obtenir un llistat de proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1 i es van analitzar i validar algunes d'aquestes proteïnes mitjançant estudis bioquímics. Aquests estudis van mostrar una interacció directa entre MLC1 i GlialCAM (o HepaCAM). Posteriorment, el grup de la Dra. van der Knaap va realitzar estudis genètics de *GLIALCAM* en els pacients de MLC que no presentaven mutacions en *MLC1*. Aquests estudis van demostrar que *GLIALCAM* és el segon gen implicat en la malaltia (López-Hernández et al., 2011a).

El gen *GLIALCAM* (o *HEPACAM*) [MIM 611642] està localitzat en el cromosoma 11q24.2 i conté 7 exons i una regió no codificant a l'extrem 3'. Aquest gen codifica per la proteïna GlialCAM de 416 aminoàcids.

Fins al moment hi ha descrites 16 mutacions diferents en *GLIALCAM* (Taula 2). D'aquestes mutacions, 11 són *missense*, 2 són delecions, 1 és inserció+deleció i 2 són *nonsense* (Van der Knaap et al., 2012). S'ha observat que les mutacions a *GLIALCAM* causen l'aparició de diferents fenotips (MLC2A o MLC2B) segons el tipus d'herència que presenten (López-Hernández et al., 2011a).

Zona	Tipus de mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna	Herència
Exó 2	Deleció	c.404_406delAGA	p.Lys135del	Dominant
Exó 3	Deleció	c.461_462delCA	p.Ser154TyrfsX17#	Recessiva
Exó 3	Inserció+deleció	c.580_582delinsTT	p.Leu194PhefsX61	Recessiva
Exó 1	<i>Missense</i>	c.68T>A	p.Leu23His	Recessiva
Exó 2	<i>Missense</i>	c.176G>A	p.Ser59Asn	Dominant
Exó 2	<i>Missense</i>	c.265G>A	p.Gly89Ser	Dominant
Exó 2	<i>Missense</i>	c.266G>A	p.Gly89Asp	Dominant
Exó 2	<i>Missense</i>	c.275G>A	p.Arg92Gln	Recessiva
Exó 2	<i>Missense</i>	c.274C>T	p.Arg92Trp	Dominant
Exó 2	<i>Missense</i>	c.292C>T	p.Arg98Cys	Recessiva
Exó 2	<i>Missense</i>	c.382G>A	p.Asp128Asn§	Dominant
Exó 3	<i>Missense</i>	c.442C>T	p.Pro148Ser	Recessiva
Exó 3	<i>Missense</i>	c.587C>A	p.Ser196Tyr	Recessiva
Exó 3	<i>Missense</i>	c.631G>A	p.Asp211Asn	Recessiva
Exó 2	<i>Nonsense</i>	c.298C>T	p.Arg100X	Recessiva
Exó 4	<i>Nonsense</i>	c.789G>A	p.Trp263X	Recessiva

Taula 2. Mutacions identificades en el gen *GLIALCAM* en pacients de MLC. Taula adaptada de (Van der Knaap et al., 2012).

El coneixement del segon gen de malaltia ha permès relacionar els diferents fenotips de MLC amb la informació genètica. Així, el fenotip clàssic és el més comú entre els pacients amb MLC i presenta mutacions en els gens *MLC1* o *GLIALCAM* seguint un

model d'herència autosòmica recessiva. Si el gen afectat és *MLC1* es parla del fenotip MLC1 i si el gen afectat és *GLIALCAM* es parla del fenotip MLC2A. En el cas del fenotip benigne o MLC2B, s'observen mutacions en *GLIALCAM* seguint un model d'herència autosòmica dominant (Van der Knaap et al., 2010; López-Hernández et al., 2011a).

No hi ha evidències que hi hagi d'haver un altre gen involucrat en MLC, ja que actualment totes les famílies amb pacients estudiades presenten una relació de la malaltia amb els *locus* de *MLC1* o *GLIALCAM*.

1.2.3. LA PROTEÏNA MLC1.

El gen *MLC1* codifica per una proteïna de membrana que porta el mateix nom (Leegwater et al., 2001; Teijido et al., 2004). La proteïna humana està composta per 377 aminoàcids i presenta un pes molecular al voltant de 41 kDa.

Segons prediccions bioinformàtiques, MLC1 consta de 8 dominis transmembrana units per 4 dominis (*loops*) extracel·lulars petits (5-8 aminoàcids) i 3 intracel·lulars, dos d'ells curts (7-9 aminoàcids) i un llarg, el qual divideix la proteïna en dues regions pràcticament simètriques entre sí. A més a més, els extrems N-terminal i C-terminal són intracel·lulars (Boor et al., 2005) (**Figura 4**).

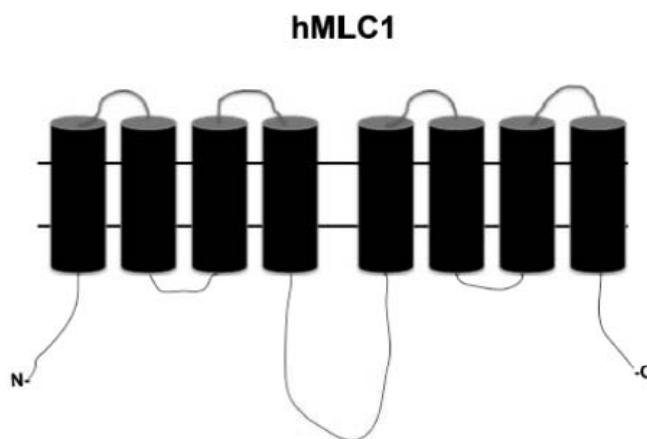


Figura 4. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1 humana, segons prediccions bioinformàtiques. Es mostren els 8 segments transmembrana, els 4 *loops* extracel·lulars, els 3 *loops* intracel·lulars i els extrems N-terminal i C-terminal.

El gen *MLC1* no es troba present en tots els filums animals. S'ha observat que la proteïna MLC1 es comença a expressar en els cordats que contenen mielina com el cas del *Zebra fish*.

Realitzant estudis d'alineament entre seqüències de varis ortòlegs de MLC1 en mamífers, aus i peixos s'ha observat que els dominis transmembrana i la regió distal

de l'extrem C-terminal es troben altament conservats, principalment entre ratolí, rata i humà. Aquest fet suggereix que aquests dominis han de tenir una funció important. En canvi, la regió N-terminal difereix molt entre les diferents espècies estudiades.

1.2.3.1. Expressió i localització de la proteïna MLC1.

S'han portat a terme diferents estudis per definir la localització de MLC1 tant en cervell de ratolí com en teixit adult humà mitjançant immunohistoquímica (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007, 2005; Duarri et al., 2008, 2011). Tots els estudis han detectat MLC1 principalment en la glia de Bergman en el cerebel, en cèl·lules endodials rodejant els ventricles i en astròcits al voltant de les regions subpial i perivascular. No s'ha detectat expressió en la microglia o en els oligodendròcits. En el cas de les neurones, s'havia detectat MLC1 en els tractes axonals però estudis recents del nostre grup i altres grups utilitzant el ratolí *knock-out* de MLC1, mostren que la senyal observada era inespecífica i per tant, no es detecta expressió a les cèl·lules neuronals.

Mitjançant microscopia electrònica d'alta resolució (*immunogold*), s'ha pogut descriure que tant en teixit humà com en ratolí, MLC1 està present a les unions astrocitàries perivasculars i no a les unions entre l'astròcit i la cèl·lula endotelial (Duarri et al., 2011; Teijido et al., 2007) (**Figura 5**).

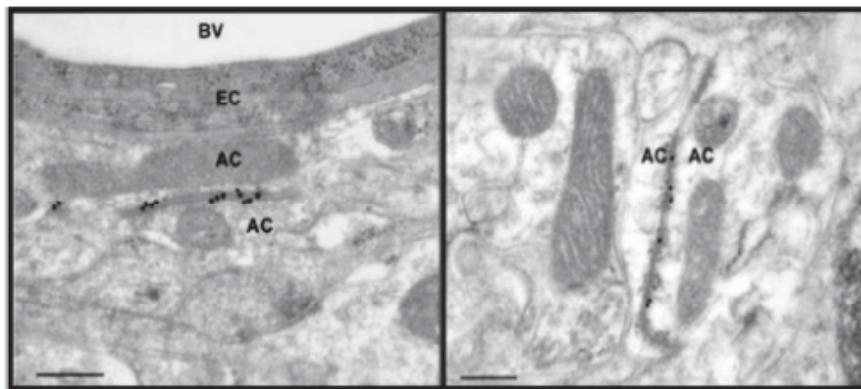


Figura 5. Localització de MLC1 a nivell de microscopia electrònica. S'observa que MLC1 es troba a les unions entre astròcits, ja sigui a zones perivasculars o als processos astroglials, però no en unions de contacte directe amb la làmina basal del vas sanguini. Abreviatures: AC, astròcit; EC, cèl·lula endotelial; BV, vas sanguini. Imatge adaptada de (Teijido et al., 2007).

Estudis de microscopia confocal i de fraccionament bioquímic i coimmunoprecipitació van mostrar que MLC1 colocalitzava amb les proteïnes del complex *distrophin-glycoprotein* (DGC) als peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007). Possiblement, la microscopia confocal no va oferir suficient resolució per diferenciar entre la membrana astrocitària i la de la cèl·lula

endotelial i entre les membranes en contacte entre astròcits rodejant el vas sanguini. Aquest fet, va mostrar discrepàncies amb estudis més recents que utilitzaven doble *immunogold* en teixit humà, i van mostrar que MLC1 i β -Distroglicà (proteïna localitzada a la membrana astrocitària en contacte amb la làmina basal que forma part del DGC) no colocalitzaven, pel que es podia concloure que MLC1 no és un component del DGC (Duarri et al., 2011). No obstant, no es pot descartar que MLC1 i les proteïnes del DGC interaccionin durant el tràfic cap a la membrana astrocitària ja que en cultius d'astròcits s'ha observat colocalització a nivell dels compartiments intracel·lulars (Ambrosini et al., 2008).

Realitzant estudis de localització de MLC1 en cultius primaris d'astròcits de rata els quals s'ha tractat amb compostos que bloquegen la proliferació cel·lular, s'ha pogut observar l'expressió i localització de la proteïna a les unions entre astròcits (Duarri et al., 2011) (Resultats i discussió. Capítol 3). Per altra banda, altres estudis realitzats en cultius primaris d'astròcits sense tractar han detectat la proteïna endògena de manera difusa al citoplasma, colocalitzant amb marcadors endosomals i del reticle endoplasmàtic (Ambrosini et al., 2008).

1.2.3.2. Estructura i funció de MLC1.

Existeixen evidències bioquímiques que suggereixen que MLC1 forma homo-oligomers ja que la detecció de la proteïna per WB reconeix principalment dues bandes amb un pes aproximat de 37 KDa i 70 KDa que probablement corresponen a les formes monomèriques i dimèriques de la proteïna. També s'ha observat mitjançant estudis de tràfic, que MLC1 oligomeritza amb ella mateixa i que aquesta unió no depèn de ponts disulfur.

La proteïna presenta una baixa probabilitat de tenir un lloc de glicosilació (NPS) entre els segments transmembrana 3 i 4 i així s'ha vist que no es troba glicosilada (Tejido et al., 2004). Per altra banda, estudis bioquímics utilitzant proteïnes de fusió que contenen els extrems N-terminal i C-terminal de MLC1, indiquen que els dos extrems són fosforilats per la quinasa A/C en el residu Ser27 i per la quinasa C en el residu Ser339. El tractament amb activadors d'aquestes quinases incrementa la presència d'una banda de 60 KDa, la qual s'ha suggerit que representa a MLC1 associat a la membrana plasmàtica i que augmenta la presència de la proteïna en els processos astrocitaris (Lanciotti et al., 2010). No obstant, no està clar si aquests residus estan involucrats en aquest efecte ja que no s'han realitzat estudis de mutagènesi eliminant aquestes dues Serines.

Segons prediccions bioinformàtiques MLC1 té una baixa homologia amb el canal *Shaker-like voltage-gated potassium channel* (Kv1.1), especialment en l'àrea del sensor de voltatge (Teijido et al., 2004). Aquesta baixa similitud amb canals iònics i el fenotip vacuolitzant de la malaltia, han fet pensar que MLC1 pugui ser un canal iònic pròpiament, una subunitat d'un canal o un transportador relacionat amb l'homeòstasi de l'aigua (Kaganovich et al., 2004; Leegwater et al., 2001; Teijido et al., 2004). No obstant, estudis de *voltage clamp* amb oòcits de *Xenopus* i en cèl·lules tsA-201 no han pogut confirmar cap d'aquestes hipòtesis (Kaganovich et al., 2004; Teijido et al., 2004).

Per altra banda, s'ha demostrat que l'expressió de MLC1 indueix de manera molt baixa l'activitat VRAC (*volume-regulated anion channel*) en cèl·lules HEK i Sf9. A part, s'han fet estudis electrofisiològics en línies de limfoblasts procedents de pacients i en astròcits mancats de MLC1 mitjançant RNA d'interferència i s'ha observat que aquestes cèl·lules mostren una menor activitat VRAC (Ridder et al., 2011). Aquests resultats no indiquen que MLC1 sigui l'entitat molecular de VRAC o que reguli directament el canal ja que moltes proteïnes o estats cel·lulars poden influir a aquesta activitat. S'ha observat que la manca de MLC1 en els cultius d'astròcits provoca vacuolització intracel·lular (Duarri et al., 2011). Com que en la biòpsia del cervell d'un pacient de MLC, les vacuoles s'havien observat a la mielina (Van der Knaap et al., 1996), no es sabia la rellevància de la vacuolització astrocitària dels cultius. La reexaminació de la mateixa biòpsia ha permès trobar vacuoles en astròcits de la zona perivascular (**Figura 6**).

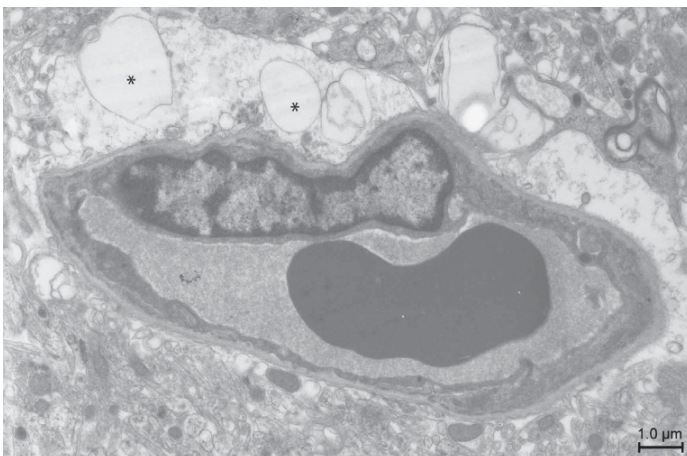


Figura 6. Imatge de microscopia electrònica del cervell d'un pacient de MLC. S'observa un peu astrocitari projectat cap a un vas sanguini el qual presenta vacuoles (asteriscs). Imatge extreta de (Duarri et al., 2011).

La disminució de l'activitat VRAC és el primer defecte funcional trobat en la malaltia MLC. VRAC és responsable del flux d'osmòlits i de clorur davant d'un xoc osmòtic (Ernest et al., 2005). Aquest flux d'ions i osmòlits és acompanyat d'un flux d'aigua en

un procés anomenat *Regulatory Volume Decrease* (RVD) (Pasantés-Morales et al., 2006). Podria ser que els astròcits en absència de MLC1 no puguin eliminar tota l'aigua ja que mostren una activitat VRAC disminuïda i una activitat RVD més lenta, i s'emmagatzemi amb la formació de vacuoles intracel·lulars. De totes maneres la relació entre MLC1 i VRAC segueix sent desconeguda.

També s'ha suggerit la relació entre MLC1 i el mecanisme de RVD mitjançant la interacció amb la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa. Estudis de doble híbrid han descrit que MLC1 interacciona amb la subunitat β -1 de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa i per tant, podria formar part del complex multiproteic format pel canal de potassi Kir4.1, caveolina-1, sintrofina, aquaporina-4 i Na^+/K^+ -ATPasa. Aquest complex està involucrat en el control osmòtic intracel·lular i la regulació del volum en astròcits i pot interactuar amb TRPV4, un canal de calci que actua com a sensor ja que en condicions hipoosmòtiques fa augmentar la concentració de calci intracel·lular que és essencial pel mecanisme de RVD (Brignone et al., 2011; Lanciotti et al., 2012).

Tot i que el fenotip que s'observa als pacients de MLC i els resultats obtinguts suggereixen que MLC1 ha de tenir un paper en el flux d'aigua o ions a través de la membrana, la funció de MLC1 segueix sense estar definida.

1.2.3.3. Mutacions de *MLC1*.

Les mutacions en *MLC1* es troben repartides al llarg de tot el gen (Leegwater et al., 2001). Diferents grups han estudiat diferents mutacions de *MLC1* en sistemes heteròlegs, després d'incorporar aquestes mutacions *missense* a través de mutagènesi dirigida. S'ha observat que la majoria de mutacions *missense* mostren una disminució dels nivells d'expressió en comparació amb la proteïna *wild type* així com una menor arribada a la membrana plasmàtica (**Figura 7**) (Lanciotti et al., 2010; Montagna et al., 2006; Teijido et al., 2004).

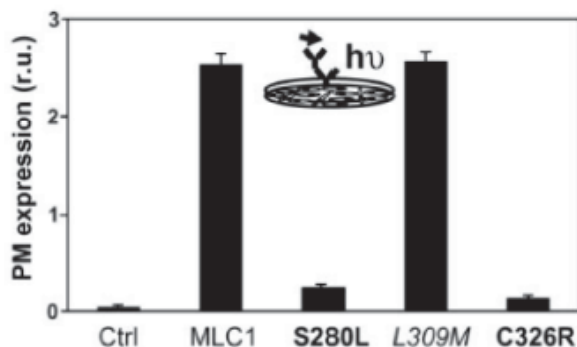


Figura 7. Estudis de tràfic a la membrana plasmàtica per part de variants mutants de *MLC1*. S'observa com les variants mutants S280L i C326R de MLC1 mostren una afectació en l'arribada a la membrana en comparació amb la proteïna *wild type*. El polimorfisme L309M associat amb l'esquizofrènia catatònica no presenta defecte en el tràfic a la membrana. Imatge extreta de (Teijido et al., 2004).

A més a més, algunes mutacions afecten el plegament i disminueixen l'estabilitat de la proteïna (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004). La majoria de mutacions queden retingudes al reticle endoplasmàtic on són dirigides a la degradació per proteasoma, però algunes mutacions arriben a la membrana plasmàtica i són degradades en els lisosomes (Duarri et al., 2008).

En qualsevol cas, totes les mutacions porten a una major reducció o absència d'expressió de MLC1 a la membrana plasmàtica i aquest fet probablement explica la falta de correlació genotip-fenotip.

1.2.4. LA PROTEÏNA GLIALCAM.

El gen *GLIALCAM* codifica per una proteïna de membrana que porta el mateix nom (Moh et al., 2005). La proteïna humana està composta per 416 aminoàcids i presenta un pes molecular al voltant de 72 kDa.

Mitjançant programes informàtics, s'ha predit una regió extracel·lular que conté un pèptid senyal i dos dominis *Immunoglobulin-like*: un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim al domini transmembrana. La proteïna presenta una sol domini transmembrana i una cua citoplasmàtica intracel·lular (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005). El domini extracel·lular presenta 6 llocs putatius de N-glicosilació, mentre que el domini citoplasmàtic conté un domini d'unió a PDZ de tipus III, una zona rica en prolins que putativament poden representar llocs d'unió a dominis SH3 i llocs potencials de fosforilació per les serina/treonina quinases i les tirosina quinases (Moh et al., 2005). (**Figura 8**).

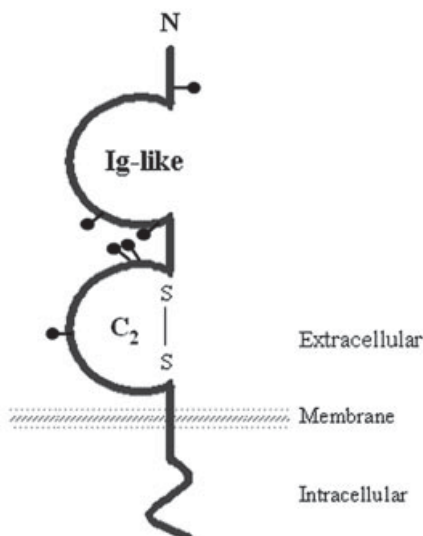


Figura 8. Esquema de l'estructura secundària de GlialCAM. GlialCAM presenta l'estructura típica de les molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines. Conté un fragment extracel·lular que inclou un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim a la regió transmembrana amb un pont disulfur format entre dos residus de cisteïna (S—S). A més a més, presenta una regió transmembrana seguida d'una cua citoplasmàtica. La proteïna presenta 6 llocs putatius de N-glicosilació a la part extracel·lular (representats en forma de punts negres). Imatge extreta de (Moh et al., 2005).

1.2.4.1. Expressió i localització de la proteïna GlialCAM.

Estudis realitzats en cervell humà mostren una expressió majoritària de GlialCAM a la substància blanca i a les cèl·lules endotelials. L'expressió de GlialCAM a la substància blanca es centra als peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. A més a més, s'ha observat expressió de GlialCAM als axons, a les regions de contacte entre la mielina i els axons, sobre les capes externes de la mielina i en oligodendròcits (Favre-Kontula et al., 2008; López-Hernández et al., 2011a).

No hi ha estudis realitzats sobre l'expressió de GlialCAM durant el desenvolupament en humans però s'ha observat un increment de l'expressió durant el desenvolupament postnatal en ratolins. Aquests canvis en l'expressió corresponen amb canvis en l'expressió de la proteïna bàsica de la mielina (MBP), fet que suggereix un possible rol de GlialCAM durant el desenvolupament (Favre-Kontula et al., 2008).

Mitjançant microscopia electrònica s'ha descrit la colocalització de GlialCAM amb MLC1 a les unions astrocitàries (**Figura 9**) (López-Hernández et al., 2011a). Aquesta localització en astròcits depèn del citoesquelet d'actina (Duarri et al., 2011; Moh et al., 2009).

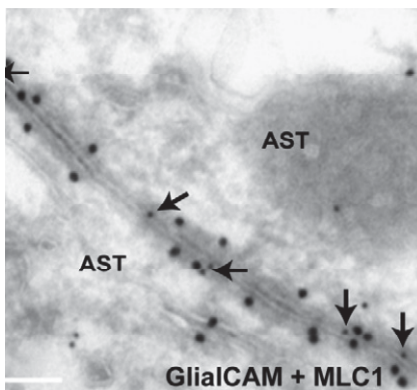


Figura 9. Imatge de microscopia electrònica d'una mostra de teixit cerebral humà. Mitjançant una doble *immunogold* s'observa la colocalització entre MLC1 (partícules de 18 nm) i GlialCAM (partícules de 12 nm, fletxes) a les unions entre astròcits. Abreviatures: AST, astròcit. Imatge extreta de (López-Hernández et al., 2011a).

Per altra banda, estudis realitzats en cultius primaris d'astròcits de rata mostren una localització a la membrana plasmàtica amb una concentració de l'expressió a les regions de contacte entre astròcits (López-Hernández et al., 2011a). Mitjançant línies cel·lulars s'ha suggerit que la localització de GlialCAM depèn de la confluència cel·lular. En condicions d'alta confluència es localitza majoritàriament a la membrana cel·lular i a les regions de contacte entre cèl·lules, mentre que en condicions de baixa confluència mostra una localització difusa en el citosol (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005).

1.2.4.2. Estructura i funció de GlialCAM.

S'ha demostrat que GlialCAM dimeritza formant interaccions homofíliques per mitjà d'experiments de coimmunoprecipitació o amb la utilització d'agents *cross-linkers* i observant la mida obtinguda per WB (Moh et al., 2005). S'han utilitzat aquests mateixos *cross-linkers* per identificar si la formació dels homodímers és en *cis* o en *trans*, utilitzant-los amb cèl·lules adherides a una placa o en suspensió i s'ha vist que la homodimerització succeeix majoritàriament en *cis* (Moh et al., 2005). A més a més, també s'ha demostrat l'homodimerització en *cis* de GlialCAM per mitjà d'altres mètodes com el mètode de complementació de fragments de proteïnes Split-TEV (López-Hernández et al., 2011b).

Per altra banda, les zones d'unió a dominis SH3 i els llocs potencials de fosforilació presents al domini citoplasmàtic, podrien ser importants per les cascades de senyalització que controlen l'adhesió, la migració o la morfologia cel·lular així com processos relacionats amb el citoesquelet i la localització (Moh et al., 2005).

La funció de GlialCAM al cervell humà és completament desconeguda. Fins aquest moment, els estudis realitzats amb GlialCAM sota el nom d'HepaCAM han estat enfocats en el context del càncer. S'ha observat que els nivells d'expressió són molt baixos o inexistents en diferents teixits tumorals i línies cel·lulars. La inhibició de l'expressió de GlialCAM està associada a la carcinogènesi i la re-expressió inhibeix el creixement i la proliferació de les cèl·lules tumorals (Xun et al., 2010; Zhang et al., 2011). Per altra banda, estudis realitzats en cèl·lules de glioblastoma humà han mostrat que GlialCAM indueix la diferenciació d'aquestes cèl·lules. Una alta expressió de la proteïna accelera l'adhesió cel·lular i inhibeix la migració i la proliferació, mentre que una baixa expressió o un trencament de l'adhesió cel·lular contribueixen a la migració i la proliferació accelerant la progressió tumoral i la metàstasi (Lee et al., 2009; Xun et al., 2010).

Estudis bioquímics en el context de MLC demostren que una de les funcions de GlialCAM és actuar com a subunitat β de MLC1 necessària per la correcta localització de MLC1 a les unions cel·lulars. Les dues proteïnes interaccionen fortament i de manera directa i això provoca la concentració de MLC1 a les unions cel·lulars (**Figura 10**) (López-Hernández et al., 2011b). En canvi, l'expressió i la localització de GlialCAM són independents de MLC1 (López-Hernández et al., 2011b). El fet que GlialCAM no estigués obligatòriament associada amb MLC1 indicava que havia de presentar altres funcions per si sola o associada amb altres molècules.

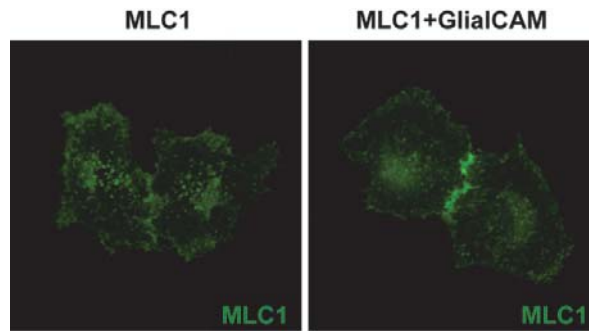


Figura 10. Canvis en la localització subcel·lular de MLC1 per part de GlialCAM en cèl·lules HeLa. S'observa la localització de MLC1 a la membrana plasmàtica quan és transfectada sola i la localització als contactes entre cèl·lules al ser cotransfectada juntament amb GlialCAM.

Recentment, s'ha descrit GlialCAM com a subunitat auxiliar del canal de clorur CIC-2. Per identificar les proteïnes que podien formar part de l'interactoma de GlialCAM, el nostre grup va realitzar la mateixa aproximació proteòmica que havia realitzat per MLC1. Els estudis de purificació per afinitat han identificat CIC-2 com una de les proteïnes que més co-purifiquen amb GlialCAM i per tant, aquestes dues proteïnes són susceptibles d'estar interaccionant (**Figura 11**) (Jeworutzki et al., 2012).

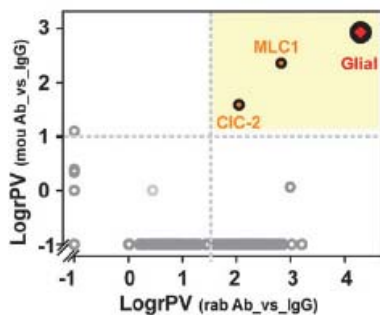


Figura 11. Avaluació de la purificació per afinitat de GlialCAM en extractes de cervell de ratolí. Esquema de l'enriquiment relatiu de les proteïnes obtingudes en les purificacions per afinitat respecte les IgG control. Les proteïnes que co-purifiquen específicament es mostren a l'àrea groga. Imatge adaptada de (Jeworutzki et al., 2012).

Estudis bioquímics han mostrat la interacció directa entre les dues proteïnes i estudis d'immunofluorescència han mostrat que GlialCAM canvia la localització subcel·lular de CIC-2 localitzant el canal als contactes d'unió entre cèl·lules (**Figura 12**).

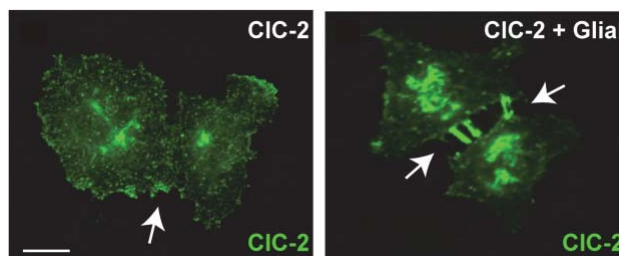


Figura 12. Canvis en la localització subcel·lular de CIC-2 per part de GlialCAM en cèl·lules HeLa. S'observa la localització de CIC-2 bàsicament intracel·lular i a la membrana plasmàtica quan és transfectat sol i la localització als contactes entre cèl·lules al ser cotransfectat juntament amb GlialCAM. Imatge adaptada de (Jeworutzki et al., 2012).

Sorprenentment, en realitzar estudis electrofisiològics de l'activitat de CIC-2 en oòcits de *Xenopus*, cèl·lules HEK i cultius astrocitaris, s'ha observat que GlialCAM també incrementa les corrents de clorur generades per CIC-2 canviant les propietats d'activació i rectificació del canal (**Figura 13**).

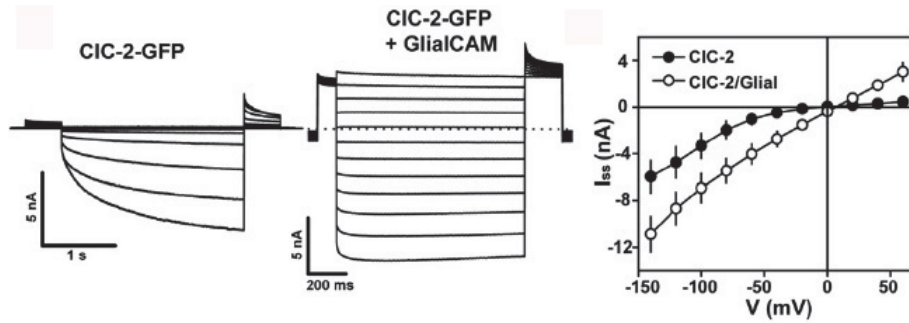


Figura 13. Canvis en l'activitat del canal CIC-2 provocats per GlialCAM en cèl·lules HEK. Es mostren traces representatives de les corrents induïdes per CIC-2 transfectat sol o cotransfectat juntament amb GlialCAM. Es representa la relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady-state*). S'observa l'activació de CIC-2 a voltatges positius i el canvi en la rectificació del canal a voltatges negatius per part de GlialCAM. Imatge adaptada de (Jeworutzki et al., 2012).

Mitjançant estudis de localització en teixit, s'ha observat que CIC-2 i GlialCAM colocalitzen als processos de la glia de Bergman i als contactes entre astròcits. El fet que el patró d'expressió de GlialCAM sigui molt més restrictiu que el patró d'expressió de CIC-2 indica que no existeix una interacció obligada, sinó que GlialCAM és una subunitat auxiliar associada amb CIC-2 únicament a les cèl·lules glials.

1.2.4.3. Mutacions de GLIALCAM.

Les mutacions en el gen *GLIALCAM* trobades en pacients amb MLC és localitzen al domini extracel·lular de la proteïna i no al transmembrana o al citoplasmàtic (López-Hernández et al., 2011a). Les mutacions amb una herència recessiva estan repartides per tota la regió extracel·lular, mentre que les mutacions amb una herència dominant estan acumulades en el domini immunoglobulina IgV de la proteïna (**Figura 14**).

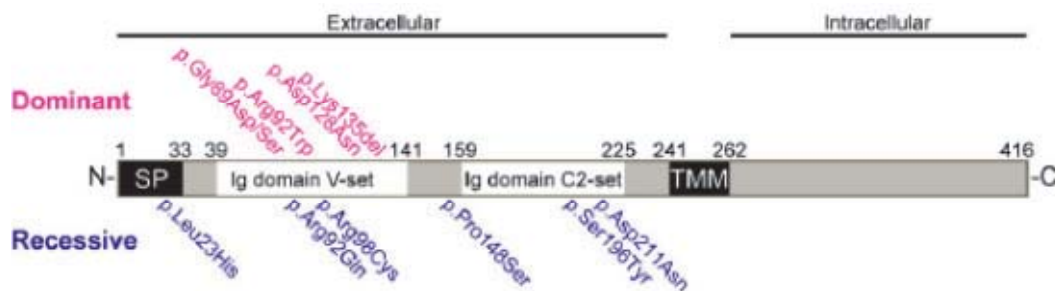


Figura 14. Representació esquemàtica dels dominis de GlialCAM i la posició de les mutacions missense. Es mostra les mutacions *missense* dominants (en rosa) localitzades al domini IgV, i les recessives (en blau) localitzades per tot el domini extracel·lular. Abreviacions: SP, pèptid senyal; TMM, domini transmembrana; Ig, immunoglobulina. Imatge extreta de (López-Hernández et al., 2011a).

Algunes de les mutacions tant dominants com recessives afecten la capacitat d'homodimeritzar de GlialCAM i causen un defecte en el tràfic a les unions cel·lulars de la proteïna (López-Hernández et al., 2011b). Aquestes mutacions també causen un defecte en la localització de MLC1 a les unions cel·lulars, tot i que no s'ha observat un defecte clar en la interacció GlialCAM-MLC1 (López-Hernández et al., 2011b). També s'ha observat un defecte per part d'algunes mutacions en la localització de CIC-2 a les unions, tot i que tampoc provoquen un defecte clar ni en la interacció ni en el canvi de funció de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012). Per altra banda, s'ha descrit que la deleció completa del domini intracel·lular no altera la localització a la membrana plasmàtica de GlialCAM ni la seva dimerització (Moh et al., 2005).

Estudis de localització de les mutacions a nivell cel·lular, mostren que el defecte en el tràfic tant de GlialCAM com de MLC1 a les unions cel·lulars provocat per les mutacions recessives pot ser rescatat amb la coexpressió de GlialCAM *wild type*, mentre que el mateix defecte causat per les mutacions dominants no pot ser rescatat per la variant *wild type* (López-Hernández et al., 2011a). Aquests estudis indiquen que la diferència entre el fenotip clàssic causat per les mutacions recessives i el fenotip benigne causat per les mutacions dominants no és degut a un efecte de dosi.

La contribució del doctorant en el descobriment de *GLIALCAM* com a segon gen de malaltia per MLC, així com la contribució en la identificació de GlialCAM com a subunitat β de MLC1 i com a subunitat auxiliar de CIC-2, no s'explica en els capítols de resultats d'aquesta Tesi ja que aquests resultats estan inclosos en la Tesi de la Dra. Tania López-Hernández. Aquestes contribucions queden reflectides i es detallen en els articles publicats inclosos a l'annex d'aquesta Tesi.

1.2.5. RELACIÓ DE CIC-2 AMB MLC.

El canal de clorur CIC-2 és una proteïna codificada pel gen *CLCN2* i pertany a la família de canals/transportadors de clorur CIC (Jentsch et al., 2005). Aquest canal presenta una expressió obliqua i particularment abundant en el cervell. Igual que MLC1 i GlialCAM mostra una localització als peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis i a la glia de Bergman i a més a més, colocalitza amb GlialCAM a les fibres mielinitzades (Blanz et al., 2007; Jeworutzki et al., 2012).

S'ha identificat la importància del canal CIC-2 glial en el manteniment de la homeòstasi del cervell i s'ha descrit que l'augment del volum cel·lular produït per condicions d'hipoosmolaritat és un dels mecanismes que poden activar el canal (Blanz et al.,

2007; Jentsch et al., 2002). Per altra banda, el ratolí *knock-out* de *CLCN2* mostra una degeneració severa de la retina i els testicles que provoca ceguera i infertilitat i sorprenentment, s'observa la presència de vacuoles a les làmines més externes de la mielina tal i com passa als pacients de MLC (Blanz et al., 2007; Bösl et al., 2001).

Totes aquestes característiques tant bioquímiques com funcionals i les vacuoles observades en els ratolins *knock-out*, han fet que *CLCN2* sigui un bon gen candidat per MLC. Diferents estudis no han trobat mutacions a *CLCN2* ni als pacients que no presentaven mutacions a *MLC1* ni a altres pacients amb alteracions a la substància blanca d'origen desconegut (Blanz et al., 2007; Scheper et al., 2010). Recentment però, s'han identificat mutacions en aquest gen relacionades amb un tipus de leucoencefalopatia d'origen desconegut que presenta microvacuolització de la mielina i característiques diferents a MLC (Depienne et al., 2013).

No s'ha pogut descriure cap relació directa entre MLC1 i CIC-2 (Duarri et al., 2011) i no s'han observat canvis en l'expressió i la localització de GlialCAM i MLC1 en el ratolí *knock-out* de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012), però la identificació de GlialCAM com a subunitat auxiliar de CIC-2 a les cèl·lules glials, és una característica que pot involucrar al canal de manera indirecta en la fisiopatologia de MLC. A més a més, en l'estudi de Depienne et al. on es compara la malaltia MLC i la leucoencefalopatia provocada per mutacions a *CLCN2* s'hipotetitza que CIC-2, MLC1 i GlialCAM podrien estar formant part de les mateixes vies de control de l'homeòstasi iònica o de l'aigua a les cèl·lules glials (Depienne et al., 2013).

1.2.6. TRACTAMENT PER PACIENTS DE MLC.

Degut al desconeixement de les funcions que poden desenvolupar les proteïnes MLC1 i GlialCAM, no és possible entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Per aquest motiu, no s'ha pogut desenvolupar cap tractament pels pacients de MLC. Únicament se'ls pot aplicar mètodes pal·liatius dels diferents símptomes de la malaltia, o bé disminuir la incidència d'aquests símptomes gràcies al diagnòstic prenatal.

2. FISIOLOGIA I FUNCIO ASTROCITÀRIA.

El paper dels astròcits és imprescindible pel correcte funcionament del sistema nerviós, ja que són les cèl·lules glials més abundants del SNC i constitueixen fins el 50% del volum total del cervell.

Els astròcits són cèl·lules estrellades amb prolongacions que es ramifiquen formant una xarxa tridimensional. Segons la forma d'aquestes prolongacions es poden dividir en protoplasmàtics i fibrosos. Els astròcits protoplasmàtics són els que es troben principalment a la substància gris i presenten unes prolongacions molt ramificades al voltant de somes i dendrites neuronals. En canvi, els astròcits fibrosos es troben en la substància blanca i les seves prolongacions són llargues i primes contactant amb els vasos sanguinis (peus astrocitaris), constituint la unitat neurovascular del SNC.

Els astròcits estan polaritzats en dos dominis funcionals, un on la part més extensa de la membrana s'encara i contacta amb les sinapsis, i l'altre que es caracteritza per la formació de llargs processos que culminen als peus astrocitaris terminals que envolten els capil·lars sanguinis (Benarroch, 2005). Cada astròcit ocupa el seu propi espai anatòmic, i aquest volum d'actuació que ocupa és el seu domini funcional. Diversos estudis han definit que un únic astròcit està en contacte amb entre 4 i 8 somes neuronals i amb entre 300 i 600 dendrites procedents de diferents neurones (Benarroch, 2005; Theodosis et al., 2008). Aquesta organització dels astròcits s'anomena illa funcional de sinapsis on diferents sinapsis veïnes poden ser coordinades per senyals derivades d'una única cèl·lula astrocitària (Benarroch, 2005; Halassa et al., 2007).

Històricament s'han descrit els astròcits com "l'adhesiu" de les neurones en el cervell però actualment es coneix que tenen moltes i variades funcions. A part del seu paper clàssic de suport de les neurones, controlen l'homeòstasi iònica i de l'aigua del fluid extracel·lular, la regulació del metabolisme energètic i l'activitat sinàptica. A més a més, regulen els nivells de glutamat i GABA a les sinapsis, s'encarreguen de la destoxicació d'amoni, el tamponament de la concentració extracel·lular de potassi i la regulació del volum cel·lular i el pH. Així mateix, proveeixen a les neurones de nutrients metabòlics i acoblen l'activitat sinàptica amb el flux sanguini local. Participen en el manteniment de la barrera hematoencefàlica i estan involucrats en la proliferació de cèl·lules mare, així com són claus per l'extensió de les neurites i la migració axonal, participant també en la determinació del nombre de sinapsis. Protegeixen a les

neurones de l'estrès oxidatiu i propaguen i modulen les senyals excitatòries en el cervell ja que són capaços d'alliberar gliotransmissors (Benarroch, 2005; Blackburn et al., 2009; Oberheim et al., 2006).

Els astròcits tenen un paper dual en el cervell patològic ja que actuen com a sistema de defensa però al mateix temps, poden empitjorar el dany cerebral. Pertorbacions en les interaccions neurona-astròcit o alteracions en alguna de les funcions astrocitàries poden donar a lloc a moltes malalties neurològiques com ara la isquèmia cerebral, la migranya, l'edema cerebral i moltes altres malalties neurodegeneratives.

A continuació, tenint en compte les funcions astrocitàries que podrien veure's afectades en la malaltia MLC, es desenvoluparà el paper dels astròcits en el control del volum cel·lular i en el tamponament del potassi extracel·lular. A més a més, es comentarà la importància de la formació de xarxes entre cèl·lules glials per la homeòstasi iònica.

2.1. REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR.

Les cèl·lules animals tenen un volum específic definit i característic per a cada tipus cel·lular. El volum cel·lular pot ser modificat quan les condicions externes d'osmolaritat canvien o per qualsevol condició que faci variar la concentració intracel·lular d'osmòlits. La membrana cel·lular és molt permeable a l'aigua i per això, qualsevol alteració en l'osmolaritat va seguida de fluxos d'aigua en la direcció necessària per restablir l'equilibri osmòtic, amb el subseqüent canvi de volum cel·lular.

En condicions fisiològiques el volum cel·lular està compromès per la generació i dissipació de gradients microosmòtics temporals i locals, generats per les funcions normals de la cèl·lula com el transport de nutrients, la modificació del gradient iònic de la membrana provocat pels neurotransmissors, la degradació de proteïnes, la glicòlisi o la secreció vesicular.

Una cèl·lula pot presentar dos tipus d'inflaments segons les condicions cel·lulars. Existeix l'inflament hipoosmòtic, que succeeix com a conseqüència de la reducció externa d'osmòlits (condicions hipoosmòtiques del medi extracel·lular) i l'inflament isosmòtic, que succeeix com a conseqüència de canvis en la distribució intracel·lular d'osmòlits en condicions d'osmolaritat externa constant. Un inflament isosmòtic es sol manifestar en situacions de fallada energètica com en la isquèmia o la hipòxia.

Molts tipus cel·lulars tenen l'habilitat de respondre a l'inflament hipoosmòtic per mecanismes de recuperació del volum, que aconsegueixen gràcies a la mobilització dels soluts acompanyats d'aigua. Els osmòlits responsables del reajustament del volum són els ions intracel·lulars més abundants (Cl^- i K^+), juntament amb les molècules orgàniques. Aquest procés s'anomena *regulatory volume decrease* (RVD). No es coneixen les particularitats del procés de RVD en condicions d'inflament isosmòtic.

Contràriament, pot existir una reducció del volum cel·lular com a conseqüència d'una hiperosmolaritat del medi extracel·lular que provoqui un encongiment de la cèl·lula. El procés de resposta a aquestes condicions s'anomena *regulatory volume increase* (RVI) i implica l'acumulació d'ions essencials (Na^+ i Cl^-) i d'osmòlits orgànics dins la cèl·lula. El procés de RVI està a càrrec dels cotransportadors de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ i de transportadors específics d'aminoàcids i polialcohols que actuen d'osmòlits (Jayakumar and Norenberg, 2010; Jayakumar et al., 2011; Kimelberg, 2004a, 2004b; Kimelberg et al., 2006; Pasantes-Morales et al., 2000).

2.1.1. REGULACIÓ DEL VOLUM EN ASTRÒCITS.

En el cervell existeixen 4 tipus de compartiments que contenen fluids: la sang en la vasculatura cerebral, el fluid cerebroespinal en el sistema ventricular i l'espai subaracnoid, el fluid intersticial en el parènquima cerebral, i el fluid intracel·lular que contenen les neurones i la glia. Aquests fluids tenen el seu propi volum i composició, i cada espai està separat dels altres per barreres que permeten el pas d'aigua i soluts de manera selectiva.

Les alteracions del volum cel·lular en el cervell comporten conseqüències dràstiques ja que els límits d'expansió imposats pel crani són mínims per esmorteir un augment del volum cerebral. Aquest fet pot provocar una compressió dels vasos sanguinis i causar episodis d'hipòxia i isquèmia, compromentent la funció i supervivència neuronal.

L'augment de volum cel·lular és més predominant en astròcits que en neurones. Els astròcits són molt permeables a l'aigua i aquesta flueix a través de la membrana, dirigida pel gradient de pressió osmòtica o afavorida bidireccionalment per la presència d'aquaporines (AQP4). En condicions d'hipoosmolaritat, un astròcit es comporta com un osmòmetre perfecte i la magnitud de l'augment del volum és proporcional a la reducció osmòtica. Així, canals iònics, transportadors i canals d'aigua són les

molècules implicades en aquest augment del volum cel·lular astrocitari i en el mecanisme associat de RVD (Kimelberg, 2005).

L'exposició dels astròcits a la hipotonicitat *in vitro* ha permès avançar en el coneixement del mecanisme de RVD, el qual es pot dividir en tres etapes diferents (Benfenati and Ferroni, 2010):

1. La creació d'un gradient intracel·lular d'osmòlits causa un inflament cel·lular degut a que l'aigua és conduïda osmòticament cap a dins la cèl·lula per difusió passiva a través del canal AQP4.
2. Els astròcits inflats perceben el canvi de volum, el qual dispara una cadena de reaccions bioquímiques amb l'objectiu de recuperar l'homeòstasi i el volum cel·lular.
3. Els mecanismes efectors d'osmotransducció promouen l'alliberació d'osmòlits orgànics i inorgànics i aigua, la qual permet recuperar el volum cel·lular.

2.1.1.1. Sensors volumètrics i osmotransducció.

El primer pas de la regulació del volum són els sensors que activen els mecanismes de correcció del volum. S'ha suggerit que en els mecanismes de percepció del canvi de volum estan implicades proteïnes transmembrana com les integrines, els receptors amb activitat tirosina quinasa (TKRs), els receptors acoblats a proteïna-G (GPCRs) o els canals receptors de potencial (TRPCs) (Pasantés-Morales et al., 2006; Vázquez-Juárez et al., 2008). Aquestes proteïnes són activades per hipoosmolaritat i provoquen canvis en les condicions intracel·lulars com la reorganització del citoesquelet o canvis en la concentració de Ca^{2+} intracel·lular. Aquestes característiques juntament amb la dilució de macromolècules citosòliques o la disminució de la força iònica com a conseqüència de l'entrada d'aigua, actuen com a senyals cel·lulars per detectar canvis en el volum (Benfenati and Ferroni, 2010; Vázquez-Juárez et al., 2008).

També s'han relacionat amb la detecció dels canvis de volum altres canals catiónics no selectius que han sigut identificats com osmo- i mecano-sensibles. S'han implicat els canals TRPV1, TRPV2 i TRPV4 en la percepció i els mecanismes de transducció dels estímuls osmòtics. Més concretament, s'ha mostrat que el canal TRPV4 està involucrat en l'homeòstasi del volum cel·lular i en el procés de RVD en varis tipus cel·lulars incloent astròcits corticals de rata (Becker et al., 2005, 2009; Benfenati et al., 2007; Liu et al., 2006; Pan et al., 2008). TRPV4 s'expressa a les membranes astrocitàries terminals en contacte amb els vasos sanguinis, on també s'expressa en abundància AQP4. S'ha suggerit que el complex AQP4 i el canal TRPV4 constitueixen

un element clau en l'homeòstasi del volum cerebral, ja que funcionarien com a osmosensor acoblant l'estrès osmòtic a les cascades de senyalització cel·lular i així s'estaria connectant el sensor de la senyal amb el mecanisme de resposta (Benfenati et al., 2011).

Totes aquestes proteïnes que actuen com a sensors dels canvis en el volum cel·lular, activen una sèrie de vies de senyalització involucrades en la reorganització del citoesquelet i la supervivència cel·lular. Aquesta cascada de senyalització activada per l'inflament hipoosmòtic, modula els fluxos de Cl^- i K^+ regulats per volum i la sortida d'osmòlits orgànics amb el procés de RVD (Vázquez-Juárez et al., 2008).

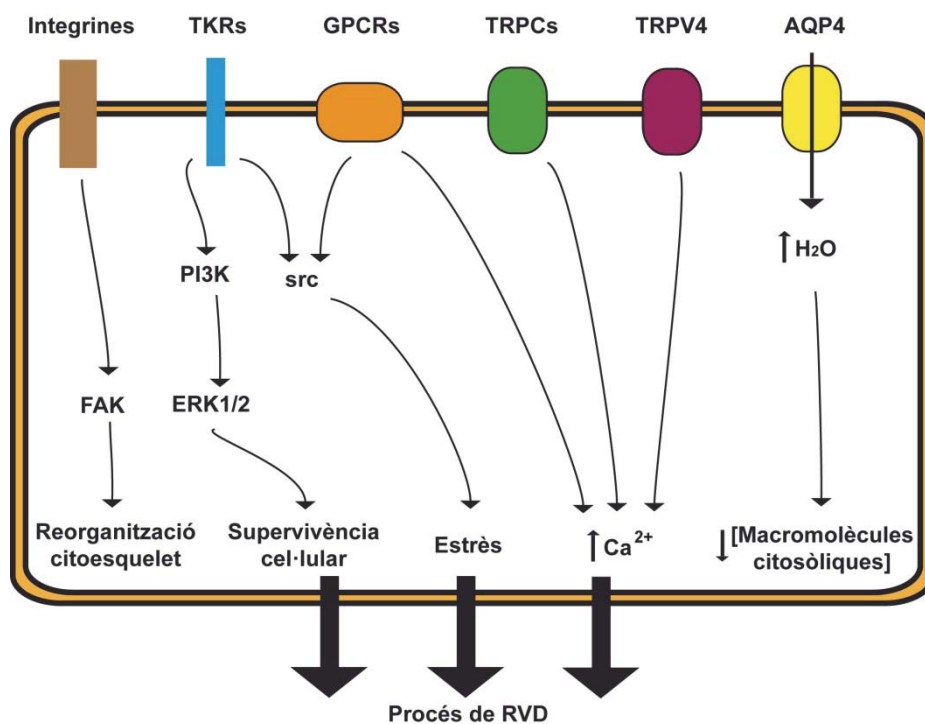


Figura 15. Model esquemàtic del mecanisme molecular involucrat en la resposta als canvis de volum. Les diferents proteïnes que actuen com a sensors dels canvis de volum activen una sèrie de vies de senyalització cel·lular que modulen el procés de RVD per reajustar el volum.

2.1.1.2. Vies de transport d'osmòlits.

Els osmòlits implicats en la regulació del volum són tant ions inorgànics com petites molècules orgàniques, les quals inclouen sucres, aminoàcids, polialcohols i metilamines. L'expulsió o l'entrada d'aquests ions i molècules orgàniques són els mecanismes més ràpids per contrarestar els canvis de volum.

En el mecanisme de RVD (**Figura 16 A**) per contrarestar l'augment del volum cel·lular, existeix una sortida predominant dels ions intracel·lulars més abundant (Cl^- i K^+) i d'osmòlits orgànics com els aminoàcids excitatoris glutamat i aspartat, juntament amb

taurina i ATP (Kimelberg et al., 1990, 2006; Pasantes-Morales and Martín del Río, 1990; Pasantes-Morales et al., 2006).

En el cas dels osmòlits orgànics com ara els aminoàcids excitatoris glutamat o aspartat, s'ha proposat que el flux de sortida en resposta als canvis de volum s'efectua a través de l'activitat dels canals VSOAC (*volume sensitive organic anion channels*) pels quals no es coneix l'entitat molecular. Aquesta activitat s'activa en condicions d'hiposmolaritat i altes concentracions de K^+ i depèn de calmodulina i de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Anderson and Swanson, 2000; Kimelberg, 2005). L'activitat VSOAC podria estar relacionada amb l'activitat VRAC (*volume-regulated anion channels*), la qual també promou fluxos d'osmòlits orgànics (Kimelberg et al., 2006).

En el cas dels ions inorgànics, s'han diferenciat mecanismes de sortida de K^+ i de sortida de Cl^- específics per cada ió en resposta a l'augment del volum cel·lular. Existeixen evidències que el flux de K^+ mitjançat per canals és important en el procés de RVD, tot i que no s'han identificat quins canals són els implicats (Benfenati and Ferroni, 2010). Per exemple, el canal de K^+ Kir4.1 és essencial per la regulació de l'augment de volum cel·lular als peus astrocitaris terminals en la medul·la espinal (Dibaj et al., 2007), però encara no existeixen evidències d'aquest mecanisme en altres regions del SNC.

El flux de sortida de Cl^- com a conseqüència dels canvis en el volum cel·lular està més estudiat. Alguns estudis mostren la possible contribució dels canals de clorur *inward rectifying* de la família CIC a la homeòstasi del volum cel·lular (Ferroni et al., 1997; Makara et al., 2003). Per altra banda, existeixen evidències *in vitro* que els canals aniónics regulats per volum VRAC (*volume-regulated anion channels*) contribueixen de manera molt important en la resposta als canvis de volum contribuint al procés de RVD (Kimelberg et al., 2006). En astròcits en cultiu, l'augment del volum cel·lular activa les corrents de VRAC, les quals promouen fluxos de Cl^- a través de la membrana i influeixen en el flux de petites molècules orgàniques osmòticament actives com la taurina, ATP i aminoàcids excitatoris (Kimelberg et al., 1990, 2006; Pasantes-Morales and Martín del Río, 1990). A més a més, estudis *in vitro* han mostrat evidències d'una interacció funcional entre AQP4 i VRAC, ja que després de disminuir l'expressió de AQP4 mitjançant siRNA s'ha observat que l'activitat VRAC disminueix (Benfenati et al., 2007). No es coneix l'entitat molecular dels canals VRAC i no se sap si VRAC és una única població de canals activats per volum o si són diferents entitats moleculars (Liu

et al., 2006). Aquests canals poden ser activats per diferents estímuls a més del increment del volum cel·lular com la hipertonicitat, la hipotonicitat o la reducció de la força iònica intracel·lular (Nilius and Droogmans, 2003). A part de la regulació del volum cel·lular se'ls han atribuït altres funcions com l'adhesió, el control del cicle cel·lular o la regulació del pH (Nilius and Droogmans, 2003).

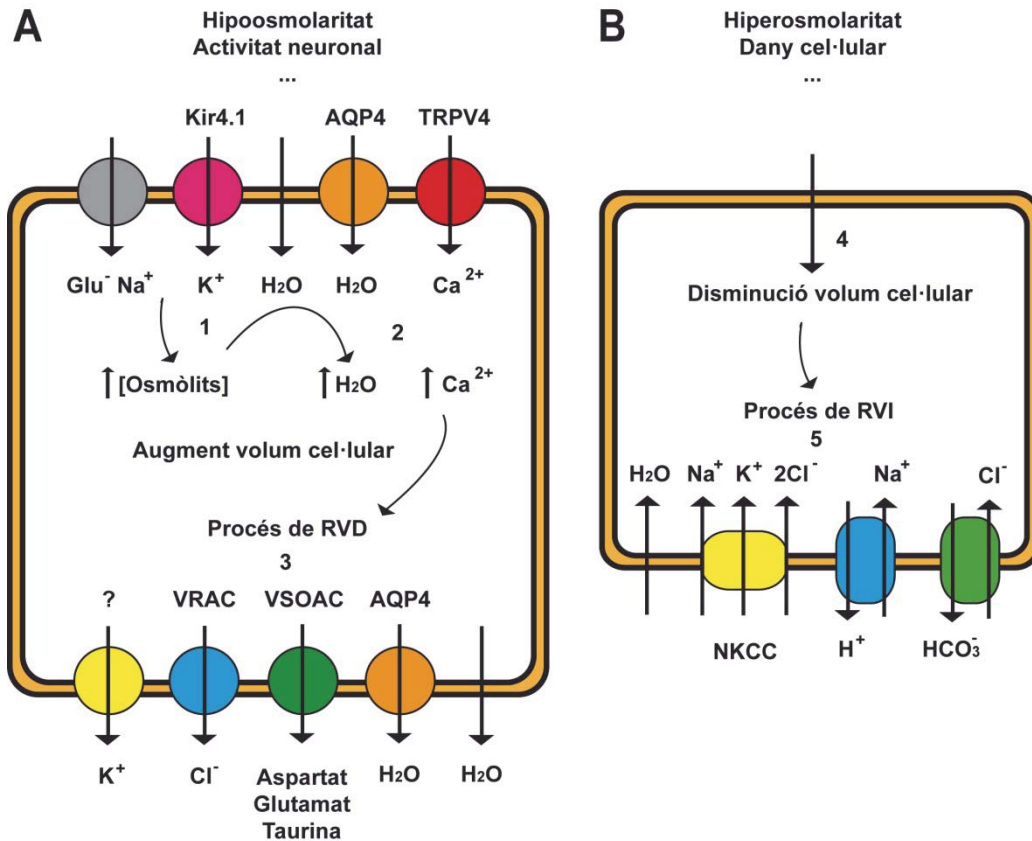


Figura 16. Esquemes dels mecanismes de control dels canvis de volum cel·lular en astròcits. A. Mecanisme de RVD. En condicions d'hiposmolaritat o alta activitat neuronal els astròcits recapten Na⁺, Glu⁻ i K⁺ mitjançant cotransportadors Na⁺/Glu⁻ i el canal Kir4.1. (1) Aquest increment de la concentració d'osmòlits va acompanyat per l'entrada d'aigua a través del canal AQP4 o per difusió passiva. (2) L'augment de la concentració de Ca²⁺ intracel·lular per part del complex TRPV4/AQP4 i l'activitat d'altres sensors, generen senyals d'osmotransducció que activen el mecanisme de RVD. (3) El procés de RVD es basa en la sortida de soluts intracel·lulars amb la conseqüent sortida d'aigua en paral·lel mitjançant canals o per difusió passiva. En aquest procés hi ha la sortida de K⁺ per part de canals desconeguts sensibles al volum, la sortida de Cl⁻ per part de l'activitat VRAC i la sortida d'osmòlits orgànics per part de l'activitat VSOAC. **B. Mecanisme de RVI.** (4) Aquest procés està menys estudiat però es sap que en condicions d'hiperosmolaritat o dany cel·lular, els astròcits pateixen una disminució del volum cel·lular que genera senyals osmotransductores que activen el mecanisme de RVI. (5) Aquest mecanisme crea un flux d'entrada de Na⁺, K⁺ i Cl⁻ que fa que hi hagi una entrada paral·lela d'aigua a la cèl·lula. S'ha relacionat el cotransportador NKCC i els intercanviadors Na⁺/H⁺ i Cl⁻/HCO₃⁻ amb aquest procés.

En el mecanisme de RVI (**Figura 16 B**) en resposta a la disminució del volum cel·lular a causa de condicions d'hiperosmolaritat, existeix una entrada de Na⁺, K⁺, Cl⁻ i aigua. En aquest procés hi estan implicats el cotransportador NKCC i els intercanviadors Na⁺/H⁺ i Cl⁻/HCO₃⁻. A més a més, la cèl·lula inhibeix els canals i transportadors de sortida de K⁺ i Cl⁻ (Jayakumar and Norenberg, 2010).

NKCC1 és un transportador que juga un paper molt important en mantenir els nivells intracel·lulars de Na^+ , K^+ i Cl^- ja que bàsicament se li associen dues funcions: participar en la recaptació de K^+ de l'espai extracel·lular durant l'activitat neuronal i contribuir en el mecanisme de RVI que ocorre després d'un xoc hiperosmòtic (Zhao et al., 2004). NKCC1 també participa durant l'augment de volum cel·lular després d'una lesió *in vitro*. S'ha mostrat que l'activitat de NKCC1 augmenta després d'un trauma en astròcits en cultiu i el bloqueig químic de l'activitat del canal o la silenciació de l'expressió mitjançant siRNA, provoca l'atenuació d'aquest augment de volum induït (Jayakumar et al., 2011). Així doncs, s'ha suggerit que bloquejar l'activitat de NKCC1 pot representar una estratègia terapèutica útil per tractar les primeres fases del dany cerebral traumàtic.

2.2. TAMPONAMENT DEL POTASSI EXTRACEL·LULAR.

L'activitat sinàptica neuronal allibera K^+ al medi extracel·lular. El cervell està preparat per resistir concentracions de K^+ de 3 mM (Moghaddam and Adams, 1987), però poden augmentar fins a 10-12 mM després de l'estimulació elèctrica o fins a 80 mM en condicions patològiques. Per tant, la concentració extracel·lular de K^+ necessita una fina regulació ja que la seva acumulació a l'espai extracel·lular pot alterar l'excitabilitat neuronal, l'alliberació de neurotransmissors, el metabolisme de la glucosa i el reg sanguini cerebral (Theodosis et al., 2008).

Existeixen principalment dos mecanismes de tamponament de potassi en astròcits: el tamponament espacial de potassi que depèn de la xarxa astrocitària (o *potassium siphoning*) i l'absorció de potassi extracel·lular via la Na^+/K^+ ATPasa i el cotransportador NKCC (Benarroch, 2005; Rash, 2010).

2.2.1. TAMPONAMENT ESPACIAL DE POTASSI (*POTASSIUM SIPHONING*).

Aquest mecanisme depèn de l'alta permeabilitat dels astròcits als ions K^+ i a la presència de la xarxa astrocitària gràcies a les unions *gap*. El K^+ és agafat per diversos canals i és transportat a través de la xarxa d'astròcits fins a ser alliberat al torrent sanguini juntament amb aigua.

Els astròcits expressen múltiples canals de potassi entre els que destaca particularment el canal *inward rectifying Kir4.1*. Aquest canal s'expressa tant a nivell de les sinapsis com als peus astrocitaris rodejant els capil·lars i permet que el moviment de K^+ sigui bidireccional en funció del gradient de K^+ transmembrana. Amb aquest canal entre altres, els astròcits transfereixen el K^+ des dels llocs on s'acumula als llocs

amb una menor concentració per finalment abocar-lo als vasos sanguinis. Aquest procés es porta a terme mitjançant un flux de corrent a través de la xarxa glial, el qual pot ser reversible.

Als peus astrocitaris s'observa la colocalització de Kir4.1 amb AQP4. Tot i que s'ha demostrat que no existeix la interacció directa entre aquestes dues proteïnes mitjançant ratolins *knock-out* (Ruiz-Ederra et al., 2007; Zhang and Verkman, 2008), existeix una relació funcional ja que aquesta coexpressió és important perquè un eficient tamponament del K^+ de l'espai extracel·lular requereix un transport paral·lel d'aigua. S'ha demostrat que l'activitat de Kir4.1 depèn de l'activitat elèctrica i que presenta una reversibilitat del pas de K^+ segons les condicions extracel·lulars per mantenir l'excitabilitat neuronal (Bay and Butt, 2012; Heuser et al., 2012). S'ha hipotetitzat que Kir4.1 pot presentar diferents funcions segons la regió on s'expressi, per exemple podria presentar una funció determinada quan es localitzés als peus astrocitaris rodejant els vasos i una altra quan es localitzés prop les sinapsis (Benfenati and Ferroni, 2010). Fins hi tot hi ha un estudi que promou la idea que Kir4.1 no té un paper predominant en l'absorció de K^+ , encara que si es defensa que aquest canal és essencial per un eficient tamponament del K^+ (Chever et al., 2010).

La correcta formació de la xarxa glial mitjançant les unions *gap* també és molt important pel procés de tamponament espacial del K^+ . S'ha observat que quan augmenta la concentració de K^+ extracel·lular a causa d'una alta activitat neuronal durant una isquèmia per exemple, incrementen els nivells d'expressió tant d'AQP4 com de Cx43 (Ribeiro et al., 2006). Una altra prova directa de la relació entre AQP4 i Cx43 s'ha obtingut en astròcits de ratolí on s'ha disminuït l'expressió d'AQP4 mitjançant RNA d'interferència i s'ha observat una disminució de l'expressió de Cx43 juntament amb una disminució de la capacitat d'acoblament cèl·lula-cèl·lula (Nicchia et al., 2005). Per altra banda, s'ha mostrat que les connexines oligodendrocitàries Cx32 i Cx47 i el canal Kir4.1 actuen a la mateixa via de control del tamponament espacial del potassi durant l'activitat axonal. Els estudis efectuats amb dobles *knock-out* de Cx32 i Cx47 mostren una vacuolització de les zones mielinitzades igual que succeeix en el ratolí *knock-out* de Kir4.1 (Menichella et al., 2006).

2.2.2. ABSORCIÓ DE POTASSI.

L'adquisició de potassi per part de les cèl·lules glials es porta a terme a través de la Na^+/K^+ ATPasa i del cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC). Aquesta absorció genera un desequilibri de càrregues que s'ha de contrarestar principalment amb l'entrada

paral·lela de Cl^- . Existeixen dues possibles vies per l'entrada de Cl^- : a través de canals específics de Cl^- (Coles et al., 1989), o recaptant-lo conjuntament amb el K^+ mitjançant el cotransportador NKCC (Amédée et al., 1997).

El cotransportador NKCC s'activa en presència d'altres concentracions de K^+ extracel·lular generant l'entrada de Na^+ , K^+ i Cl^- a la cèl·lula. Aquesta entrada d'ions provoca un increment de la concentració intracel·lular d'osmòlits, el qual comporta la reabsorció d'aigua que provoca un augment del volum cel·lular i la contracció de l'espai extracel·lular (Ballanyi et al., 1990). Així doncs, l'absorció de K^+ extracel·lular via NKCC genera l'augment del volum cel·lular astrocitari i per tant, l'homeòstasi del Cl^- intracel·lular és crítica per la regulació del volum dels astròcits. Una manera de compensar la càrrega deguda a l'absorció de K^+ és mitjançant l'intercanvi amb Na^+ per la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Si s'acobla la sortida de Na^+ via l'ATPasa amb l'activitat del cotransportador NKCC hi ha un guany net de KCl que és osmòticament actiu.

Existeixen evidències d'altres canals de K^+ que poden estar contribuint a l'absorció del K^+ extracel·lular com el cas de TREK i TWIK que pertanyen a la família de canals de K^+ amb 4 segments transmembrana i 2 porus (Seifert et al., 2009). També s'ha suggerit un paper en l'homeòstasi del K^+ extracel·lular de les corrents *outward* produïdes pel canal dependent de voltatge Kv1.5 i pels canals de K^+ activats per calci (rSlo) (Benfenati and Ferroni, 2010). A més a més, aquests canals (Kv1.5 i rSlo) colocalitzen amb AQP4 als peus astrocitaris que envolten la microvasculatura i recentment s'ha demostrat que aquesta localització també la comparteixen TREK i TWIK (Seifert et al., 2009) per tant, també s'ha implicat a tots aquests canals amb el procés de tamponament de K^+ extracel·lular.

Tots els mecanismes de tamponament del potassi extracel·lular (per difusió, per tamponament espacial i/o per entrada de K^+ en associació amb el Cl^- mitjançant canals de Cl^- o el cotransportador NKCC) tenen l'avantatge que no requereixen despesa energètica per les cèl·lules gials i que són mecanismes reversibles quan la concentració de K^+ extracel·lular es redueix a causa de la reabsorció neuronal. El tamponament espacial és el mecanisme principal durant l'activitat fisiològica normal. En canvi, la reabsorció del K^+ té una major contribució en condicions patològiques com la isquèmia o un atac epilèptic. No obstant, l'absorció de K^+ juntament amb Cl^- té la contrapartida de l'augment del volum cel·lular i això pot derivar en la formació d'un edema. És en aquests casos quan és més important la contribució de la bomba Na^+/K^+ ATPasa.

2.3. FORMACIÓ DE XARXES ENTRE CÈL·LULES GLIALS.

Els astròcits presenten la xarxa de cèl·lules unides més abundant en el SNC, anomenada comunicació glial per unions *gap*. Aquesta xarxa juga un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi, el pH extracel·lular i els nivells de K^+ i glutamat, i també indirectament en la pressió vascular, la sinapsi neuronal, i el tràfic de glucosa des dels vasos a les neurones. A part d'aquestes funcions de comunicació, les unions *gap* també tenen un paper important en la morfologia cel·lular i en l'organització del citoesquelet (Yamane et al., 2002). Les funcions astrocitàries també tenen una gran importància en relació amb els processos de mielinització. S'han observat astròcits i oligodendròcits intercalats formant xarxes que s'estenen al llarg de tota la fibra nerviosa (Reynolds and Wilkin, 1991). La presència d'unions entre les diferents cèl·lules glials constitueix una unitat tant funcional com anatòmica (Suzuki and Raisman, 1994). Així doncs, existeixen xarxes generades a partir d'unions mixtes d'astròcits i oligodendròcits (Giaume and Venance, 1995) que donen lloc a un sinciti general comú entre aquestes cèl·lules glials, que s'estén radialment des del canal espinal i els ventricles cerebrals fins la glia que envolta l'epiteli vascular, passant per regions de les substàncies blanca i gris (Rash, 2010; Rash et al., 1997).

Els astròcits estan connectats entre si o amb els oligodendròcits per mitjà d'unions tipus *gap*. El diàmetre del canal de les unions *gap* es d'uns 1,2 nm i permet la comunicació cèl·lula-cèl·lula gràcies al pas de molècules petites d'uns 1000 Da, com són ions, missatgers secundaris, metabòlits, nucleòtids i pèptids petits (Sargiannidou et al., 2010). En aquesta unió, cada membrana contribueix amb un hemicanal (o connexó) (Abrams and Scherer, 2012; Sargiannidou et al., 2010). Cada connexó està format per 6 connexines que es disposen al voltant d'un porus central. Els hemicanals individuals poden estar compostos per un únic tipus de connexines (homomèrics) o per diferents tipus de connexines (heteromèrics). Així mateix, les unions *gap* es poden formar amb hemicanals iguals (unió homotípica) o diferents (unió heterotípica) (**Figura 17**).

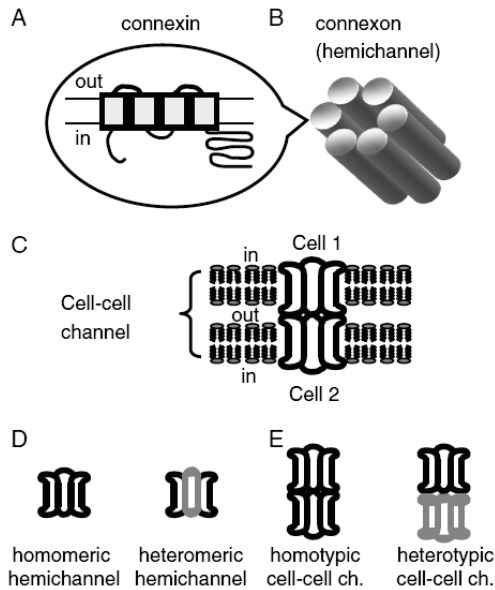


Figura 17. Nomenclatura d'unions gap. **A.** Les connexines són proteïnes integrals de membrana amb 4 dominis transmembrana i els extrems N- i C-terminal intracel·lulars. **B.** Cada connexó o hemichanal està compost per 6 connexines. **C.** Les unions *gap* donen lloc a canals que estan compostos per l'ancoratge de dos connexons que provenen de cèl·lules oposades. **D.** Si les 6 subunitats que formen el connexó estan compostes per la mateixa connexina, el connexó s'anomena homomèric. En canvi, si la connexió està composta per connexines diferents, és un hemichanal heteromèric. **E.** Les unions *gap* entre cèl·lules es poden formar mitjançant un mateix tipus de connexó (unió homotípica) a amb diferents connexons (unió heterotípica). Imatge estreta de (Abrams and Scherer, 2012).

Els astròcits expressen tres tipus de connexines: Cx43, Cx30 i Cx26 (Nagy et al., 2004), sent la Cx43 la més freqüent (Giaume and Venance, 1995). Per altra banda, als oligodendròcits hi destaquen les connexines 32, 47 i 29 que formen unions *gap* entre oligodendròcits, entre les capes de la mielina i també amb astròcits.

Les unions *gap* entre astròcits solen ser homomèriques compostes per Cx43/Cx43 o Cx30/Cx30. Per altra banda, entre oligodendròcits també s'observen unions *gap* homomèriques. Per exemple, la Cx32 s'expressa majoritàriament a les fibres mielinitzades de la substància blanca formant unions *gap* dins les capes de mielina i la Cx29 sol formar hemicanals dins la mielina de petites fibres en alguns tractes de la substància blanca de la medul·la espinal (Abrams and Scherer, 2012; Sargiannidou et al., 2010). Per últim, s'ha observat que les unions entre astròcits i oligodendròcits solen ser heteromèriques entre Cx30 i Cx32 o entre Cx43 i Cx47 (Abrams and Scherer, 2012; Sargiannidou et al., 2010).

A part de les connexines, en els últims anys s'ha descrit una nova família de proteïnes que poden formar hemicanals funcionals, anomenades pannexines (pannexina1 i pannexina2) (Shestopalov and Panchin, 2008). S'ha observat expressió d'aquestes proteïnes a les neurones i s'ha suggerit que tenen un paper en la comunicació interneuronal (Vogt et al., 2005). A més a més, també s'ha observat que quan s'activa la glia reactiva a causa de condicions de dany cerebral, es detecta transitòriament la pannexina2 en astròcits (Zappalà et al., 2007).

La formació d'aquesta xarxa glial entre astròcits i oligodendròcits és important per la formació de la mielina. Per exemple, mutacions que afecten al gen que codifica per la Cx43 astrocitària donen lloc a la displàsia oculodentodigital on els pacients mostren una desmielinització (Abrams and Scherer, 2012; Sargiannidou et al., 2010). Així mateix, l'acoblament per unions *gap* entre astròcits i oligodendròcits, també és important per formar la xarxa glial necessària pel tamponament del K^+ extracel·lular durant l'activitat neuronal en les proximitats dels axons mielinitzats (Rash, 2010).

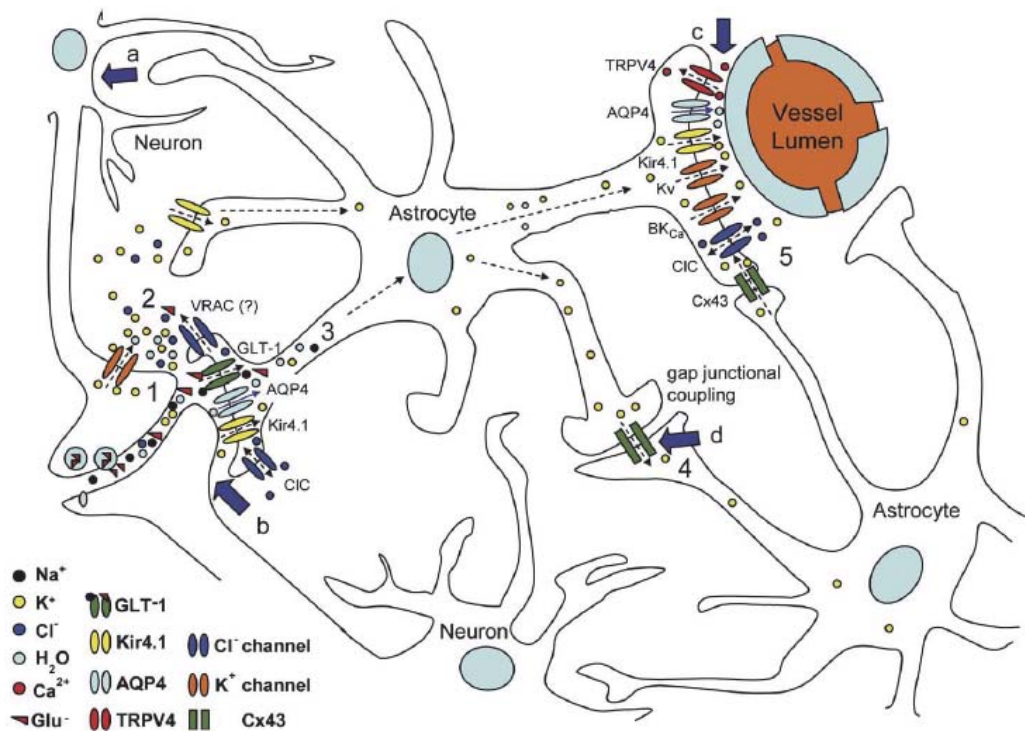


Figura 18. Resum dels mecanismes astroglials implicats en l'homeòstasi extracel·lular. La morfologia astrocitària en el cervell es caracteritza per un cos cel·lular irregular que genera diferents processos. Aquests processos poden contactar amb el soma neuronal (a), envoltar les sinapsis (b) o envoltar els vasos sanguinis (c). Per la seva part, els astròcits estan connectats entre si per unions *gap* (d) que permeten la sincronització de les respostes a les cèl·lules distals del sinciti astroglial. Aquesta arquitectura és important pel manteniment de l'homeòstasi extracel·lular. (1) Com a resultat de l'activació d'un potencial d'acció s'alliberen neurotransmissors i ions a l'espai extracel·lular de la zona perineuronal. (2) Els astròcits recapten el potassi i el glutamat extracel·lular acumulat. (3) El glutamat és recaptat a través dels cotransportadors GLT-1 i GLAST, mentre que el potassi pot ser recaptat per diferents canals on el més important en la zona perineuronal és el canal Kir4.1. (4) L'excés de potassi intracel·lular és redistribuït espacialment via unions *gap* per tot el sinciti astrocitari fins que és avocat al corrent sanguini via Kir4.1 juntament amb l'activació d'altres canals com BKCa o Kv (5). Durant el procés de tamponament de potassi es crea un gradient osmòtic que és contrarestat per un flux d'aigua. El moviment osmòtic de l'aigua es realitza a través del canal AQP4 que s'expressa a les regions astrocitàries que envolten les sinapsis i als peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. La concentració del clorur intracel·lular és clau per la regulació d'aquests processos. La contribució dels canals de clorur de la família de CIC en aquest procés encara no està clara. Per altra banda, els canals VRAC contribueixen en el manteniment del volum cel·lular. Finalment no es coneix clarament la funció del canal TRPV4 però es proposa que pot funcionar com a osmosensor de les condicions extracel·lulars del medi i activar els processos de control del volum cel·lular. Les bombes i transportadors que contribueixen als moviments transmembrana dels ions no han estat inclosos. Imatge extreta de (Benfenati and Ferroni, 2010) .

3. MÈTODES PER L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES.

Les interaccions entre proteïnes (PPIs) són essencials per la majoria de funcions cel·lulars i biològiques mitjançades per macromolècules (Cusick et al., 2005; Morsy et al., 2008; Ngounou Wetie et al., 2013; Petschnigg et al., 2011a). Les interaccions entre proteïnes de membrana són especialment importants ja que una tercera part del proteoma està format per proteïnes de membrana (Petschnigg et al., 2011a). Processos fonamentals com la transcripció gènica, el control del cicle cel·lular, la transducció de senyals o processos de regulació, depenen del correcte funcionament dels complexos proteics. Pertorbacions en la formació d'aquests complexos poden generar disfuncions cel·lulars que en últim terme, provoquen l'aparició de malalties. Per tant, identificar, localitzar, quantificar i modelar les xarxes proteiques creades per proteïnes que interaccionen (o interactomes), és la clau per entendre les bases dels processos biològics cel·lulars i per caracteritzar les funcions de les proteïnes, així com per entendre la fisiopatologia de malalties i com a conseqüència, definir noves estratègies terapèutiques (Morsy et al., 2008; Petschnigg et al., 2011b).

Les PPIs es caracteritzen mitjançant paràmetres de cinètica i termodinàmica. Algunes formen interaccions estables d'alta afinitat, mentre que altres formen una interacció més dinàmica utilitzant una unió de baixa afinitat (Lalonde et al., 2008). La unió entre dues proteïnes està basada en la forma i la química de la superfície d'unió (per exemple, la composició d'aminoàcids o l'estructura terciària de les proteïnes) (Reichmann et al., 2007). Les PPIs poden succeir entre polipèptids idèntics o no idèntics (homo- o hetero-oligomers) i també es poden classificar com a complexos obligats o no obligats i en permanents o transitoris segons la vida mitja del complex (Nooren and Thornton, 2003). Les proteïnes que interaccionen tenen superfícies complementaries i les forces que estableixen la interacció són idèntiques a cada proteïna. Les interaccions iòniques, dipols, ponts d'hidrogen, forces de van der Waals o interaccions hidrofòbiques entre altres, són molt importants en el plegament i en la interacció de les proteïnes (Lalonde et al., 2008; Ngounou Wetie et al., 2013; Reichmann et al., 2007).

S'han desenvolupat diferents metodologies per detectar i analitzar PPIs. Aquest camp està en constant evolució ja que existeixen múltiples tipus d'interaccions entre proteïnes de naturalesa diversa. Els diversos mètodes de detecció difereixen en la sensibilitat, especificitat i habilitat per detectar interaccions de diferents afinitats. Per

això, la selecció del mètode correcte és crucial per la descripció de la interacció entre dues proteïnes (Lalonde et al., 2008).

Les dues metodologies més emprades per mapar interaccions entre proteïnes són el sistema de doble híbrid en llevats (Y2H) i la immunoprecipitació per afinitat seguida d'espectrometria de masses (AP-MS) (Cusick et al., 2005; Morsy et al., 2008; Williamson and Sutcliffe, 2010). Aquestes dues tècniques han esdevingut importants degut a que s'han pogut efectuar estudis a gran escala i així s'ha obtingut gran quantitat d'informació, tot i que poden generar falsos positius d'interacció (Lalonde et al., 2008). En el cas de la metodologia de Y2H, els falsos positius apareixen ja que en aquest mètode es sobreexpressa les proteïnes que es vol testar i això modifica la concentració relativa d'aquestes proteïnes en comparació amb l'estat *in vivo*. A més a més, la utilització de sistemes heteròlegs pot introduir o eliminar l'activitat de competició que existeix en els sistemes naturals. Per contra, l'anàlisi mitjançant extractes cel·lulars que s'efectua en la metodologia de AP-MS, barreja proteïnes procedents de diferents compartiments subcel·lulars i tampoc reflecteix la situació *in vivo*, creant els falsos positius d'interacció (Lalonde et al., 2008).

Existeixen gran quantitat de metodologies per identificar els complexos proteics, ja siguin mètodes bioquímics, biofísics, genètics, proteòmics o bioinformàtics realitzats *in vitro*, *in vivo* o *in silico*. A continuació s'aprofundeix en alguns dels mètodes més utilitzats en la identificació de les interaccions entre proteïnes.

3.1. MÈTODES BIOQUÍMICS.

Els mètodes bioquímics presenten una relativa alta especificitat i una fàcil i econòmica implementació i utilització. Habitualment, es solen combinar diferents mètodes bioquímics entre ells per identificar els diferents components dels complexos proteics i a més a més, són compatibles amb la utilització d'altres tècniques a posteriori com l'espectrometria de masses. En aquest tipus de mètodes però, existeix un alt risc de detectar interaccions inespecífiques a causa de l'abundància de proteïnes contaminants de la interacció. A més a més, les proteïnes d'alt pes molecular són difícils d'analitzar i a vegades es necessita realitzar modificacions prèvies als anàlisis bioquímics per destruir l'entorn cel·lular. Per últim, en els casos que s'hagi de requerir la utilització d'anticossos per identificar una interacció, no sempre es pot disposar d'anticossos amb una alta especificitat per totes les proteïnes (Smirle et al., 2013). Habitualment, després d'utilitzar algun dels mètodes bioquímics, el complex purificat

és analitzat electroforèticament amb un gel *SDS/PAGE* i els membres obtinguts són posteriorment identificats per espectrometria de masses (MS).

Existeixen diverses aproximacions bioquímiques per estudiar la formació de complexos proteics.

3.1.1. COIMMUNOPRECIPITACIÓ (CO-IP).

La coimmunoprecipitació (Co-IP) és un dels mètodes més potents per identificar interaccions físiques entre dues o més proteïnes *in vivo*. Aquest mètode detecta un complex proteic a partir d'un extracte cel·lular o d'un homogenat de proteïnes, mitjançant un anticòs específic contra una proteïna del complex. Aquest anticòs està immobilitzat amb proteïna A, proteïna G o lligat covalentment. A partir d'aquesta immunodetecció es poden identificar les proteïnes que puguin estar interaccionant amb la proteïna que s'ha immunoprecipitat amb l'anticòs (Ngounou Wetie et al., 2013).

3.1.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ PER AFINITAT (AP).

La immunoprecipitació per afinitat (AP) és una tècnica similar a la Co-IP. Es basa en la fusió d'un epítip o *tag* a la proteïna per la qual es vol buscar companys o *partners* d'interacció. Un cop la proteïna s'ha posat en contacte amb l'extracte cel·lular es purifica el complex proteic per afinitat o immunoafinitat. Entre els epítips més utilitzats es troba la Histidina (His), la glutatona S-transferasa (GST), la proteïna d'unió a maltosa (MBP), el pèptid d'unió a calmodulina (CBP) o pèptids petits com per exemple myc.

Una nova variant de l'AP que evita algunes inespecificitats metodològiques és el mètode **TAP** (*tandem affinity purification*). En aquest cas, l'epítip està format per un fragment d'unió a immunoglobulina G i el pèptid CBP. El fragment d'unió a immunoglobulina G consta de fragments de la proteïna A de *Staphylococcus aureus* i de pèptids sensibles a l'acció de la proteasa del virus mosaic del tabac (TEV). En aquesta metodologia, la purificació del complex proteic es fa en dos passos. Primer s'uneix a una columna de proteïna G sefarosa (per mitjà de la proteïna A de l'epítip). Posteriorment, s'allibera el complex mitjançant l'acció catalítica de la proteasa TEV i finalment, es torna a purificar mitjançant una columna de Calmodulina sefarosa (Morsy et al., 2008; Ngounou Wetie et al., 2013).

Degut a la naturalesa dels mètodes de Co-IP i AP, existeixen moltes dificultats a l'hora d'identificar interaccions dèbils o poc estables, ja que habitualment aquests mètodes

requereixen varis rentats per eliminar interaccions inespecífiques. Per altra banda, si es coneix que la interacció succeeix en una determinada regió subcel·lular, es pot augmentar considerablement l'especificitat de detecció realitzant prèviament un pas de fraccionament subcel·lular (Jansen et al., 2012; Smirle et al., 2013).

3.1.3 CROSS-LINKING.

El *cross-linking* és un altre mètode bioquímic molt potent per detectar interaccions proteiques i per mapar estructures de complexos proteics amb una baixa resolució. Aquesta tècnica utilitza agents químics amb dos o més grups reactius que estan connectats per una regió separadora o *linker*. Amb la tècnica de *cross-linking* les interaccions entre proteïnes dèbils o transitòries queden estabilitzades a través d'unions covalents. Habitualment s'utilitzen grups amina-reactius, sulfhydryl-reactius o photo-reactius. Un cop s'ha aplicat l'agent químic, es trenca la cèl·lula i s'observa les proteïnes que han quedat unides a través del *cross-linker*. Un punt important a l'hora de decidir el *cross-linker* a utilitzar, és la flexibilitat i la mida del braç separador ja que moltes interaccions cel·lulars succeeixen en un ampli rang de distàncies (Ngounou Wetie et al., 2013).

3.1.4. TÈCNICA DE BLUE NATIVE PAGE.

La *Blue Native PAGE* (BN-PAGE) (Schägger and Von Jagow, 1991) és una tècnica electroforètica que utilitza les propietats del compost de tinció *Comassie blue G* (CBG). Aquest compost s'uneix a les proteïnes o als complexos proteics i permet que siguin aïllats i separats en un gel d'acrilamida a partir de la càrrega externa induïda pel CBG i la massa molecular dels complexos estudiats (Ngounou Wetie et al., 2013). El mètode BN-PAGE es pot utilitzar per determinar el pes molecular de complexos proteics entre 10 i 10.000 kDa. A més a més, es pot combinar amb altres mètodes per determinar l'estat oligomèric, l'estequiometria, l'activitat enzimàtica o l'estructura molecular de complexos multiproteics.

El mètode de BN-PAGE permet estudiar electroforèticament les proteïnes de membrana amb una alta resolució. A més a més, aquest mètode manté l'activitat funcional enzimàtica de molts dels complexos estudiats (Ngounou Wetie et al., 2013; Reisinger and Eichacker, 2006). Es poden realitzar variacions del mètode que augmentin la resolució per identificar tots els components dels complexos proteics. Així, posteriorment a la separació per pes molecular es pot afegir una segona dimensió separant les proteïnes pel seu punt isoelèctric (2D PAGE) i una tercera dimensió utilitzant condicions desnaturant *tricine*-SDS-PAGE (3D PAGE). Els complexos

proteïcs nadius són recuperats dels gels per electroelució o difusió i poden ser analitzats per electroblotting i immunodetecció, espectrometria de masses o per cristal·lografia 2D.

Aquest mètode resulta molt útil en proteòmica per identificar canvis en la composició dels complexos proteïcs i correlacionar aquests canvis amb un estat funcional determinat d'un teixit o una fracció cel·lular (Reisinger and Eichacker, 2006).

3.2. SISTEMA DE DOBLE HÍBRID EN LLEVATS (Y2H).

El sistema de doble híbrid en llevats (Fields and Song, 1989) i totes les seves variants és el mètode més utilitzat per identificar interaccions binàries entre proteïnes. Aquest mètode consisteix en fusionar a una proteïna X (*bait*) el domini d'unió al DNA (DB) d'un factor de transcripció determinat, i a una proteïna Y (*prey*) el domini d'activació de la transcripció (AD) del mateix factor de transcripció. Habitualment el factor de transcripció que s'utilitza és la proteïna Gal4 de llevats o la proteïna LexA bacteriana. En coexpressar les proteïnes X-DB i Y-AD al nucli de cèl·lules del llevat, la interacció entre X i Y reconstitueixen funcionalment el factor de transcripció que activa un o més gens reporters (**Figura 19**) (Cusick et al., 2005).

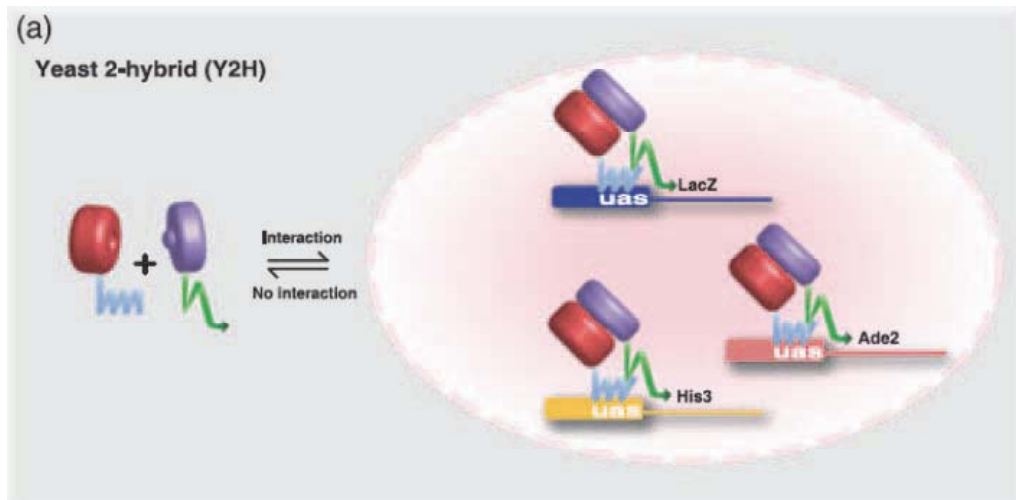


Figura 19. Esquema del sistema clàssic de Y2H. Un factor de transcripció és dividit en el domini d'activació (en verd) i en el domini d'unió al DNA (en blau) i cadascun és fusionat a les proteïnes X i Y. La interacció entre les dues proteïnes reconstitueix funcionalment el factor de transcripció i s'activen determinats gens reporters (*Ade2*, *His3* i *LacZ*). (imatge adaptada de (Lalonde et al., 2008).

Aquest mètode és fàcilment aplicable a tecnologies a gran escala i això ha permès identificar una gran quantitat de complexos proteïcs (Walhout and Vidal, 2001). No obstant, presenta certs inconvenients. Generalment es subestimen el nombre d'interaccions ja que la localització subcel·lular forçada del *bait* i el *prey* al nucli de les

cèl·lules de llevat pot excloure algunes interaccions. Aquest fet és evident en les interaccions entre proteïnes de membrana. Tampoc es detecten interaccions que requereixin modificacions post-traduccionals específiques d'enzims que no es troben en llevats. Per aquestes raons el nombre de falsos negatius és equiparable al nombre de detecció d'interaccions potencials entre proteïnes. Per poder disminuir al màxim l'aparició de falsos positius, s'han desenvolupat variants d'alta especificitat del mètode incorporant més gens reporters o eliminant els autoactivadors naturals de les cèl·lules de llevat que activen el *bait* sense la coexpressió del *prey* (Cusick et al., 2005).

3.3. MÈTODES BASATS EN LA COMPLEMENTACIÓ DE FRAGMENTS DE PROTEÏNA (PCA).

Els mètodes basats en la complementació de fragments de proteïna (PCA) han esdevingut protagonistes en l'estudi d'interaccions de proteïnes de membrana en els últims anys (Snider et al., 2010a, 2010b). En aquest tipus de mètodes, les proteïnes per les quals es vol testar interacció X i Y són fusionades a fragments complementaris d'una proteïna reportera. Si les proteïnes interaccionen, els fragments es troben i es pleguen segons l'estructura nativa reconstituïnt l'activitat de la proteïna reportera (Remy and Michnick, 2007). L'èxit d'aquests mètodes depèn de que els fragments de la proteïna reportera no es pleguin segons l'estructura nativa espontàniament i únicament ho facin per la proximitat que els hi proporciona la interacció de les proteïnes que s'estan testant (Petschnigg et al., 2011b). S'han utilitzat varies proteïnes reporteres per generar mètodes PCA per identificar interaccions entre proteïnes. Alguns exemples de proteïnes reporteres són la β -lactamasa, la TEV proteasa, la dihidrofolat reductasa (DHFR), la luciferasa o proteïnes fluorescents com la GFP.

La majoria dels mètodes PCA són irreversibles i això pot comportar la generació de falsos positius. L'únic mètode PCA reversible és el mètode BiLC que utilitza la *Renilla luciferase* com a proteïna reportera. Aquesta reversibilitat permet estudiar aspectes de cinètica i equilibri de la formació dels complexos proteics. Els mètodes PCA poden ser utilitzats en format de petita escala o de gran escala i amb assajos *in vitro* o *in vivo* amb qualsevol tipus cel·lular. Això permet detectar les interaccions entre proteïnes en el seu context natural i en el compartiment subcel·lular corresponent. (Petschnigg et al., 2011a, 2011b; Remy and Michnick, 2007).

Les característiques relatives als avantatges i inconvenients varien segons el mètode PCA que s'estigui utilitzant. Per exemple el mètode de β -lactamasa presenta una forta amplificació de la senyal que li atorga molta sensibilitat. Per altra banda, el mètode

BiFC que utilitza proteïnes fluorescentes, té l'avantatge d'emetre la senyal únicament als llocs i als moments on hi ha la interacció, determinant a la vegada interacció i localització (Petschnigg et al., 2011a; Remy and Michnick, 2007).

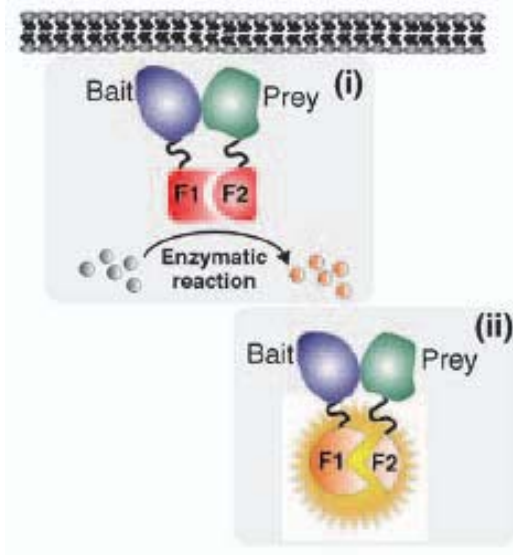


Figura 20. Exemples de mètodes basats en la complementació de proteïnes (PCA). (i). Un enzim reporter és dividit en dues parts (F1 i F2) que són fusionades a les proteïnes *bait* i *prey*. En interaccionar el *bait* i el *prey*, l'enzim reporter es reconstitueix correctament i efectua la seva activitat catalítica transformant el substrat (cercles grisos) en un producte detectable (cercles vermells). Un exemple de mètode que utilitza un enzim reporter és el BiLC (*Bimolecular Luminiscence Complementation*) que utilitza la luciferasa. (ii) Exemple del mètode BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) que utilitza una proteïna fluorescent com ara GFP o YFP. La interacció del *bait* i el *prey* provoquen la complementació d'una proteïna fluorescent que es pot detectar mesurant la fluorescència a una determinada longitud d'ona. Imatge adaptada de (Petschnigg et al., 2011b).

Entre els mètodes PCA, destaca el que s'ha anomenat sistema de doble híbrid de membrana o Split-ubiquitin (Ngounou Wetie et al., 2013).

3.3.1. SISTEMA DE DOBLE HÍBRID DE MEMBRANA EN LLEVATS (MYTH).

El sistema de doble híbrid de membrana o Split-ubiquitin és una variant del mètode Y2H per estudiar la interacció entre proteïnes de membrana que utilitza la ubiquitina com a proteïna reportera. (Lalonde et al., 2008; Snider et al., 2010a, 2010b).

Una de les funcions de la ubiquitina és fer de senyal per la degradació d'algunes proteïnes a través del proteasoma 26S. La ubiquitina es pot dividir en el fragment N-terminal (Nub) i el fragment C-terminal (Cub). Un cop les dues meitats es reconstitueixen degut a la proximitat, es forma una ubiquitina funcional que és reconeguda pels enzims desubiquitinadors citosòlics (DUBs) de la cèl·lula, que proteolitzen la proteïna per la Glicina 76 situada a la part C-terminal. En aquest mètode, a la proteïna *bait* se li fusiona el fragment Cub juntament amb un factor de transcripció artificial que està format pel domini d'unió al DNA de LexA i el domini d'activació de VP16. Per altra banda, a la proteïna *prey* se li fusiona una variant mutada del fragment N-terminal de la ubiquitina (NubG). Aquesta mutació fa disminuir l'afinitat dels dos fragments de la ubiquitina, de forma que la reconstitució només succeeix si el *bait* i el *prey* interaccionen. Per tant, quan el *bait* i el *prey* interaccionen,

es reconstitueix aquesta pseudo-ubiquitina que és reconeguda pels enzims DUBs que proteolitzen la proteïna i alliberen el factor de transcripció LexA-VP16 que activa l'expressió de diferents gens reporters (**Figura 21**) (Petschnigg et al., 2011a).

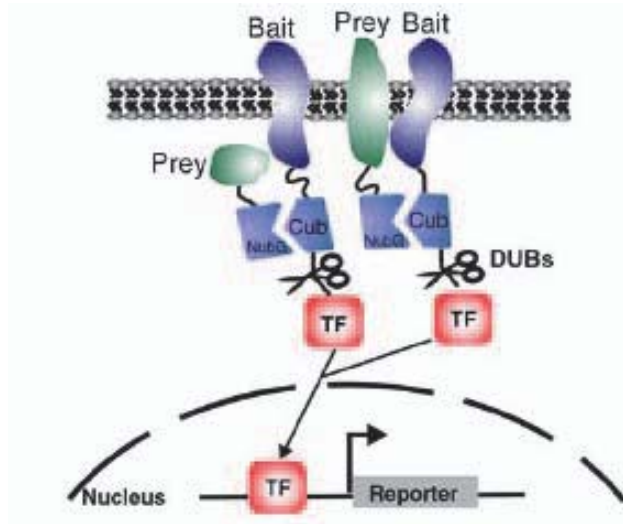


Figura 21. Sistema de doble híbrid de membrana (MYTH). A una proteïna de membrana *bait* se li fusiona la meitat C-terminal de la ubiquitina (Cub) i el factor de transcripció (TF). A la proteïna *prey* que pot ser de membrana o citosòlica, se li fusiona la meitat N-terminal de la ubiquitina mutada (NubG). Amb la interacció *bait-prey* es forma una pseudo-ubiquitina degut a la proximitat de les dues meitats, que és reconeguda per els enzims desubiquitinadors citosòlics (DUBs representats com estisores). Aquests enzims alliberen el factor de transcripció que entra al nucli per activar l'expressió d'un gen reporter. Imatge adaptada de (Petschnigg et al., 2011b).

Aquest mètode ha estat aplicat amb èxit en l'estudi d'interaccions tant estables com transitòries, en una gran varietat de proteïnes de membrana amb diferents estructures i funcions i de diversos organismes. El mètode s'ha implementat en format de petita escala i de gran escala.

3.4. MÈTODES BASATS EN LA TRANSFERÈNCIA D'ENERGIA DE RESSONÀNCIA (RET).

El principi bàsic de RET consisteix en la transferència no radioactiva d'energia des d'un cromòfor en estat d'excitació (donador) a una molècula receptora (acceptor). Entre les metodologies que utilitzen aquest principi bàsic es troba el FRET i el BRET. En el cas del FRET s'utilitzen proteïnes fluorescents, mentre que en el cas del BRET el donador és un enzim que transforma un substrat bioluminescent (Boute et al., 2002; Ciruela, 2008; Petschnigg et al., 2011b).

En el RET, com a resultat de la interacció i la transferència d'energia hi ha una reducció de l'emissió del donador i com a conseqüència un augment de la fluorescència de l'acceptor. L'eficiència d'aquesta transferència d'energia és inversament proporcional a la distància entre el donador i l'acceptor (Ciruela, 2008). S'ha proposat que per observar la transferència d'energia entre les dues molècules, aquestes han d'estar entre 10 i 100 Å de distància (Boute et al., 2002; Ciruela, 2008). Per tant, les tècniques basades en el principi de RET es poden utilitzar com a forma

per calcular la distància entre dues proteïnes. Per altra banda, l'eficiència de RET també depèn de l'orientació de l'angle entre el donador i l'acceptor o del grau de solapament entre l'espectre d'emissió del donador i l'espectre d'excitació de l'acceptor.

En la metodologia clàssica de **FRET** s'utilitzen variants de la proteïna fluorescent GFP. Habitualment la molècula donadora acostuma a ser una CFP (*Cyan Fluorescence Protein*) que s'excita a 433 nm i emet a 477 nm. Per altra banda, la proteïna receptora és una YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) que es pot excitar a 477 nm i emet a 527 nm. Cadascuna d'aquestes proteïnes es fusiona a proteïnes per les quals es vol testar interacció. Si les proteïnes interaccionen, la distància entre els dos fluoròfors serà molt petita i podrà haver-hi la transferència d'energia. Per tant, aplicant llum de 433 nm de longitud d'ona s'obtindrà una llum emesa de 527 nm de longitud d'ona i això permetrà identificar la interacció entre les proteïnes estudiades (**Figura 22 a**).

La metodologia de **BRET** és molt semblant a la de FRET, però en aquest cas la molècula donadora és un enzim luciferasa que catalitza l'oxidació d'un substrat per emetre llum. Habitualment s'utilitza la *Renilla luciferase* (Rluc) que té com a substrat la colenterazina. Com a molècula receptora s'utilitza una YFP. Si les proteïnes que tenen fusionades l'acceptor i el receptor interaccionen, en presència de colenterazina nativa la Rluc produirà llum que transferirà energia a la YFP i és podrà detectar la interacció a 527 nm de longitud d'ona (**Figura 22 b**).

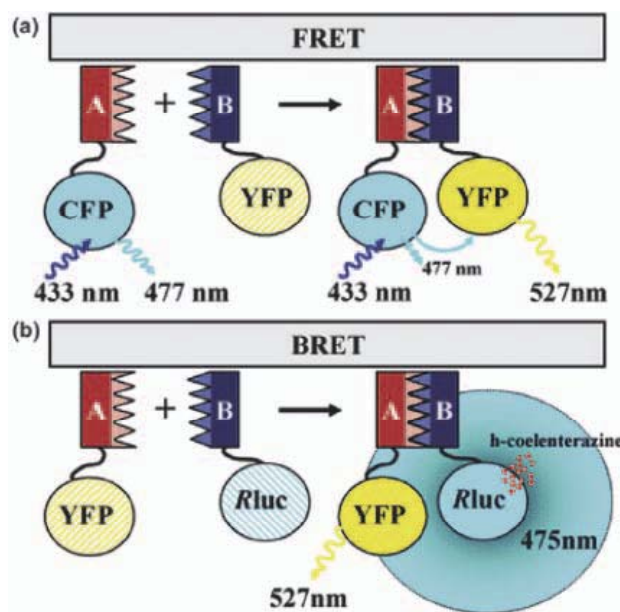


Figura 22. Exemples de mètodes basats en la transferència d'energia. (a). Representació esquemàtica de FRET. Dues proteïnes candidates a interaccionar (A i B) són fusionades a un donador (CFP) o a un acceptor (YFP). Si les proteïnes interaccionen, el donador i l'acceptor estaran a molt poca distància i existirà transferència d'energia entre el donador i l'acceptor després de l'excitació del donador. (b). Representació esquemàtica de BRET. Dues proteïnes candidates a interaccionar (A i B) són fusionades a un donador (Rluc) o a un acceptor (YFP). Si les proteïnes interaccionen, el donador i l'acceptor estaran a molt poca distància i existirà transferència d'energia entre el donador i l'acceptor després de la reacció d'oxidació de la colenterazina per mitjà de Rluc. Imatge adaptada de (Ciruela, 2008).

El màxim avantatge del FRET és que permet observar a través del microscopi la localització subcel·lular a on té lloc la interacció entre dues proteïnes. Aquesta

aproximació no es pot realitzar amb BRET degut a la baixa intensitat de llum emesa per la luciferasa (Boute et al., 2002). No obstant, un avantatge del BRET respecte el FRET és el solapament d'espectres que presenten les variants de la proteïna GFP. Aquest solapament pot causar que la longitud d'ona d'excitació del donador provoqui certa excitació de l'acceptor sense que hagi ocorregut la transferència d'energia i això genera dificultats a l'hora d'interpretar els resultats. El BRET no presenta aquest problema perquè no es necessita la il·luminació exògena (Boute et al., 2002). Altres aspectes que s'han de tenir en compte en el FRET són l'autofluorescència de les cèl·lules i la pèrdua de senyal del donador amb el temps a causa del *photobleaching*. Per altra banda, en el cas del BRET és necessari poder distribuir la colenterazina en el compartiment subcel·lular adequat per poder discriminar certes interaccions entre proteïnes (Boute et al., 2002; Ciruela, 2008).

S'han desenvolupat diferents aplicacions d'aquests mètodes que utilitzen el principi de FRET i fins i tot, s'ha aplicat una fusió dels dos mètodes en el **BRET-FRET (SRET)**. Aquest mètode ha permès identificar interaccions físiques entre tres proteïnes diferents. En aquest cas, l'oxidació de la colenterazina per part de la Rluc (fusionada a la primera proteïna d'estudi) desencadena per BRET l'excitació de l'acceptor (fusionat a la segona proteïna d'estudi) que mitjançant FRET excita un nou acceptor (fusionat a la tercera proteïna d'estudi) (Carriba et al., 2008; Petschnigg et al., 2011b).

3.5. MÈTODE DE BioID.

El mètode de BioID és un mètode que es basa en la utilització d'una proteïna de fusió que conté la proteïna d'estudi i una biotina lligasa promiscua de *E. coli*. Aquesta biotina lligasa marca selectivament per proximitat a proteïnes veïnes de la proteïna de fusió. Aquest mètode aprofita l'avantatge que la biotinilació és una modificació estranya a les cèl·lules de mamífer i per tant, es poden detectar interaccions amb gran especificitat. És un mètode fàcil i ràpid d'implementar que es pot utilitzar per identificar interaccions entre proteïnes tant citosòliques com de membrana. A més a més, permet detectar interaccions directes o indirectes tant estables com transitòries i realitzar mapatges d'entorns proteics en cèl·lules vives (Roux et al., 2012).

El mètode de BioID es basa en l'aproximació DamID que s'ha utilitzat per detectar interaccions DNA-proteïna mitjançant la metilasa procariota Dam (Van Steensel and Henikoff, 2000). En aquest cas s'utilitza una variant mutant de la proteïna BirA que és una biotina lligasa d'unió al DNA en *E. coli* que regula la biotinilació d'una subunitat de l'acetil-CoA carboxilasa i actua com a repressor transcripcional per l'operó biosintètic

de biotina (Chapman-Smith and Cronan, 1999). Aquesta variant mutant BirA* biotinila inespecíficament a totes les amines primàries per proximitat (Cronan, 2005).

Per portar a terme aquest mètode, la biotina lligasa BirA* és fusionada a la proteïna d'interès per la qual es vol testar la interacció. Un cop s'expressa la proteïna de fusió a les cèl·lules de mamífer, es suplementa el medi amb biotina i BirA* biotinila totes les proteïnes veïnes de la proteïna de fusió. Posteriorment, es lisen les cèl·lules i s'aïllen les proteïnes biotinilades mitjançant una purificació per afinitat utilitzant boles unides a streptavidina. Finalment, aquestes proteïnes poden ser identificades per espectrometria de masses (**Figura 23**).

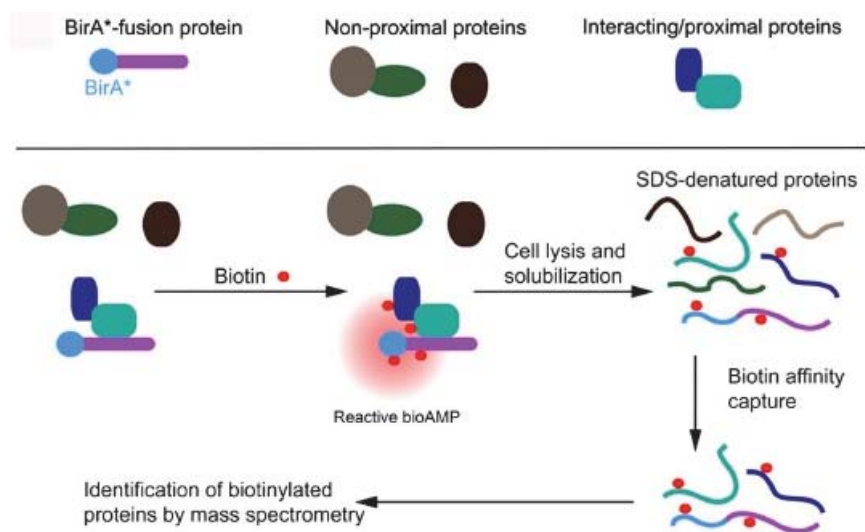


Figura 23. Esquema de l'aplicació del mètode BioID. L'expressió d'una proteïna de fusió que conté la biotina lligasa BirA* provoca la biotinilació selectiva per proximitat de les proteïnes veïnes a la proteïna de fusió. Després de la lisi cel·lular i la desnaturalització proteica, les proteïnes biotinilades són purificades per afinitat i poden ser identificades per WB o espectrometria de masses. Imatge adaptada de (Roux et al., 2012).

L'avantatge d'aquest mètode és que pot detectar interaccions en el context cel·lular real encara que siguin dèbils o transitòries ja que la biotinilació es realitza abans de la solubilització cel·lular. Per altra banda, presenta el desavantatge que BirA* és una proteïna de dimensions semblants a la GFP i això pot generar problemes, ja que la proteïna de fusió que conté BirA* ha de presentar les característiques correctes de localització i plegament a les cèl·lules. L'eficàcia del mètode BioID depèn de la capacitat de biotinilació de les proteïnes veïnes a la proteïna de fusió i això depèn del nombre d'amines primàries que continguin. Aquest fet indica que l'abundància de la proteïna biotinilada no és proporcional a la força o l'abundància de la interacció i que la no biotinilació no indica que no existeixi interacció. Per això, aquest mètode és molt eficaç per mapar associacions entre proteïnes i entorns proteics, però s'ha d'utilitzar

com a complement d'altres mètodes a l'hora de caracteritzar interaccions potencials entre proteïnes (Roux et al., 2012).

3.6. MÈTODE DE *PROXIMITY LIGATION ASSAY* (PLA).

El mètode de *Proximity Ligation Assay* (PLA) combina el reconeixement dual entre una sonda i una diana amb l'aproximació teòrica del fraccionament d'una proteïna reportera. Aquest mètode ofereix una detecció específica i sensible de proteïnes individuals o d'interaccions entre proteïnes (Söderberg et al., 2006; Weibrecht et al., 2010).

En el mètode de PLA dues sondes detecten a una proteïna o a dues proteïnes per les quals es vol testar la interacció. Aquestes sondes són oligonucleòtids els qual se'ls ha conjugat anticossos covalentment o no covalentment. Un cop els anticossos han reconegut els epítops de la proteïna corresponent, s'afegeix un oligonucleòtid connector. Si els epítops de la proteïna o les proteïnes del complex estan molt pròxims, l'oligonucleòtid connector hibrida amb els oligonucleòtids de les dues sondes generant una lligació enzimàtica dels oligonucleòtids que formen una cadena única de DNA. Aquesta nova cadena de DNA actua com a marcador de les proteïnes detectades i es pot amplificar utilitzant una reacció de PCR (**Figura 24**). Aquest mètode també es pot utilitzar per reconèixer complexos ternaris de proteïnes on la proximitat de les tres sondes crearà la molècula de DNA amplificable.

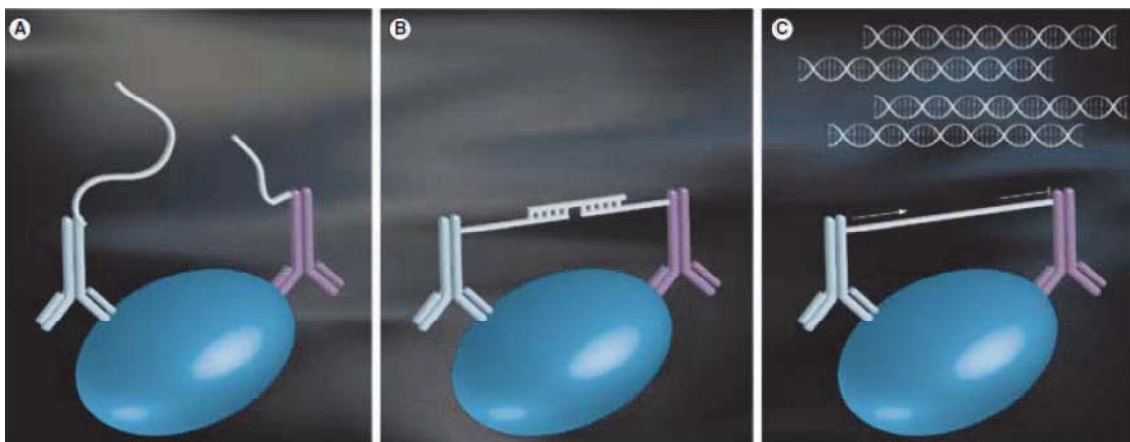


Figura 24. Esquema del mètode de PLA per reconèixer una proteïna. **A.** La proteïna diana és reconeguda per dues sondes. La proximitat de les sondes fa que els oligonucleòtids conjugats també estiguin pròxims. **B.** Un oligonucleòtid connector hibrida amb els oligonucleòtids de la sonda creant una plantilla de lligació. **C.** Únicament la nova cadena de DNA creada pot ser amplificada mitjançant la reacció de PCR. Imatge extreta de (Weibrecht et al., 2010).

S'ha desenvolupat una variant del mètode de PLA basada en la hibridació *in situ*. El mètode *in situ* PLA s'utilitza per detectar proteïnes individuals o interaccions entre

proteïnes a nivell de línies cel·lulars o teixits. En aquesta versió les cèl·lules o els teixits són fixats a un portaobjectes abans de l'adició de les sondes. Per la detecció localitzada dels complexos proteics, els oligonucleòtids conjugats a les sondes actuen de plantilla d'hibridació de dos oligonucleòtids connectors. La hibridació i la lligació depenen de la llargada i la distància que estan els oligonucleòtids de les sondes i de la mida de les proteïnes a identificar. En general, la distància funcional és semblant a la distància observada en FRET. Un cop la lligació té efecte, es genera una molècula de DNA circular que serveix com a plantilla indefinida per l'amplificació RCA (*rolling circle amplification*) mitjançada per la phi29 DNA polimerasa. Aquesta amplificació permet obtenir una alta resolució de la identificació de la proteïna o de la interacció entre proteïnes a nivell molecular i amb una quantificació relativa de la senyal obtinguda (Söderberg et al., 2006; Weibrecht et al., 2010).

La metodologia de PLA pot significar un avanç en el diagnòstic i la recerca biomèdica. Es podria utilitzar en la detecció de substàncies tòxiques en l'organisme o per observar la presència i l'activitat de proteïnes poc abundants en el sèrum o altres fluids corporals per predir o identificar malalties. També es podria utilitzar per realitzar assajos d'activitat de moltes proteïnes diferents en un mateix sèrum i així generar perfils de biomarcadors per determinades malalties (Weibrecht et al., 2010).

3.7. TÈCNICA D'ISOTOPE LABELING BY AMINOACIDS IN CELL CULTURE (SILAC).

El mètode SILAC és una tècnica simple, robusta i amb una aproximació potent que utilitza l'espectrometria de masses basada en la proteòmica quantitativa. Aquesta tècnica permet l'etiquetatge de proteomes cel·lulars a través de processos metabòlics normals, incorporant a les proteïnes de nova síntesi aminoàcids que contenen isòtops estables no radioactius. La tècnica SILAC aporta una quantificació relativa acurada sense manipulacions ni transformacions químiques i permet el desenvolupament d'estudis funcionals en proteòmica (Ong and Mann, 2006, 2007).

El mètode SILAC depèn de la síntesi de noves proteïnes cel·lulars que incorporaran aminoàcids com l'arginina o la lisina que contenen els isòtops estables. Per portar a terme el mètode, es fan créixer dues poblacions de cèl·lules en dos medis diferents, el medi "light" que conté els aminoàcids amb l'isòtop natural i el medi "heavy" que conté els aminoàcids SILAC que s'hagin escollit. La població de cèl·lules amb el medi "heavy" han de ser cultivades com a mínim durant cinc duplicacions per permetre la

incorporació dels aminoàcids SILAC. Teòricament després de cinc duplicacions, aproximadament un 97% de les proteïnes ja s'hauria de trobar en l'estat "heavy" però a la pràctica, els proteomes arriben a la incorporació completa dels aminoàcids "heavy" més ràpidament a causa de la combinació de la divisió cel·lular i la síntesi i degradació de les proteïnes. Posteriorment, les proteïnes o pèptids de la mostra "heavy" etiquetada i de la mostra "light" no etiquetada es barregen i s'analitzen per espectrometria de masses. Les proteïnes "heavy" són separades de les "light" per una diferència específica del residus que correspon al nombre d'etiquetes d'isòtops estables, així com també al nombre de residus d'aminoàcids etiquetats en la mostra (Figura 25).

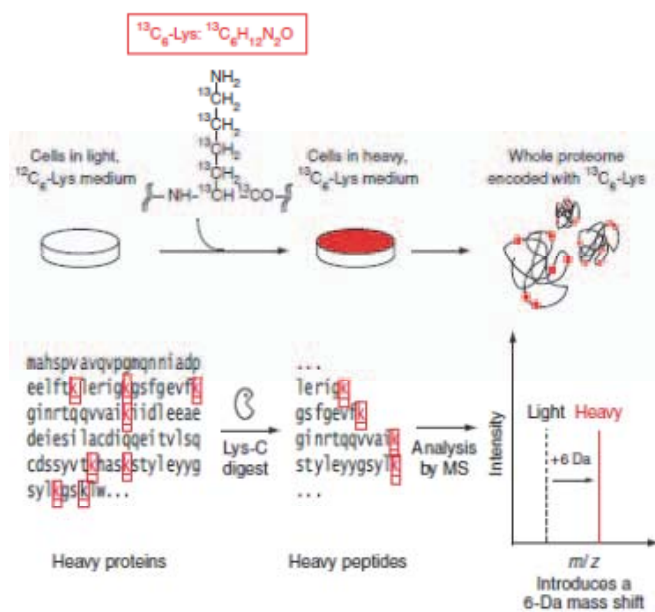


Figura 25. Codificació d'informació quantitativa de proteomes sencers amb SILAC. Cèl·lules que creixien en medis "light" són subcultivades en un medi "heavy" que conté aminoàcids etiquetats amb isòtops estables, com la Lisina que conté sis ^{13}C (marcats en vermell). El creixement cel·lular i la síntesi i el recanvi proteics fan possible la incorporació dels aminoàcids SILAC al llarg del proteoma. La digestió de les proteïnes amb Lys-C resulta en pèptids portadors de lisina- $^{13}\text{C}_6$ i en un canvi de massa específic del residu de 6 Da respecte el pèptid "light", que és detectable mitjançant espectrometria de masses. Imatge extreta de (Ong and Mann, 2006).

Pràcticament a qualsevol sistema de cultiu cel·lular on es pugui definir la font d'aminoàcids es pot aplicar la metodologia SILAC. S'ha realitzat en cèl·lules de mamífer, llevats, bacteris i plantes. En cultius de cèl·lules de mamífer s'ha utilitzat per quantificar l'abundància proteica durant el temps, per identificar proteïnes en determinades estructures cel·lulars, comparar diferents estats cel·lulars i detectar interaccions entre proteïnes (Ong and Mann, 2006, 2007). En el cas de la detecció d'interaccions entre proteïnes s'ha utilitzat per identificar la via del receptor del factor de creixement EGFR. Cultius "heavy" els quals s'ha estimulat EGFR s'han comparat amb cultius "light" sense estimular. S'ha purificat per afinitat amb EGFR els lisats obtinguts i mitjançant digestió enzimàtica i espectrometria de masses s'ha pogut identificar les proteïnes relacionades (Blagoev et al., 2003).

3.8. MICROARRAYS DE PROTEÏNES.

La tecnologia de microarrays de proteïnes es basa en la utilització de superfícies planes amb una sèrie de proteïnes immobilitzades que habitualment s'anomenen *bioxips* (Morsy et al., 2008; Petschnigg et al., 2011b; Weinrich et al., 2009). Aquests bioxips permeten l'anàlisi d'un gran nombre de mostres i una gran varietat d'aplicacions en la recerca biomèdica com l'estudi de proteòmica, la detecció de biomarcadors i el descobriment de medicaments.

La tècnica de micoarrays de proteïnes es pot dividir en dues grans categories: els arrays funcionals que s'utilitzen per definir l'activitat d'una proteïna o un agent d'interès vers una sèrie de proteïnes; i els arrays quantitius que s'utilitzen per detectar la presència i els nivells d'especificitat d'una proteïna en un determinat tipus cel·lular o teixit.

Els **arrays funcionals** també permeten identificar interaccions entre proteïnes. En aquest cas, el bioxip conté una sèrie de proteïnes o dominis de proteïnes immobilitzats. Això permet incubar una solució que conté la proteïna d'estudi (*bait*) fusionada a una sonda fluorescent o a un epítot. Si aquesta proteïna interacciona amb alguna proteïna del bioxip es podrà detectar mitjançant anticossos o fluorescència (**Figura 26 A**).

Els **arrays quantitius** són molt útils per identificar molècules específiques o biomarcadors, així com per analitzar modificacions post-traduccionals de proteïnes. Aquest format es pot realitzar de manera *forward* que consisteix en la fixació d'anticossos al bioxip, que poden reconèixer proteïnes d'un extracte cel·lular que es poden detectar amb anticossos secundaris o proteïnes marcades amb algun epítot. Per altra banda, també es pot implementar el mètode de manera *reverse* immobilitzant les proteïnes directament de l'extracte cel·lular i analitzant quines són reconegudes per l'anticòs específic que identifica els biomarcadors o les modificacions post-traduccionals (**Figura 26 B**). Els arrays quantitius són molt útils com a eina de diagnòstic en el desenvolupament de la "medicina personalitzada", ja que els pacients poden rebre tractaments basats en perfils de biomarcadors específics de cada individu (Yu et al., 2010).

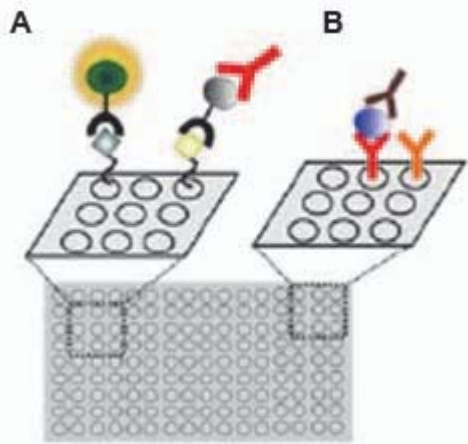


Figura 26. Exemples de microarrays de proteïnes. **A.** Exemple de microarray funcional. Una llibreria de proteïnes o molècules és immobilitzada en una superfície sòlida. Aquest array és incubat amb proteïnes *bait* marcades amb una sonda o que contenen un epítip i es poden detectar directament (per una sonda fluorescent per exemple) o per mitjà d'anticòsos. **B.** Exemple de microarray quantitatiu. Es fixen els anticòsos a la superfície sòlida i després de la incubació amb l'extracte cel·lular es poden detectar les proteïnes unides amb un segon anticòs o a través d'una sonda. Imatge adaptada de (Petschnigg et al., 2011b).

Existeixen certs avantatges dels bioxips de proteïnes respecte altres mètodes tradicionals com ara el mètode de ELISA. Amb aquests bioxips es necessita poca quantitat de mostra i per tant, és un mètode favorable per la miniaturització i la implementació a gran escala amb l'anàlisi de centenars de mostres en paral·lel. Per altra banda, el procés de preparació dels bioxips en els microarrays de proteïnes presenta complicacions degut a la naturalesa de les proteïnes. Aquesta metodologia requereix un grau d'especialització tècnica per poder immobilitzar les proteïnes o els dominis proteics als bioxips, sense afectar la integritat o la funcionalitat proteica (Weinrich et al., 2009).

3.9. MÈTODE DE SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR).

El mètode basat en el fenomen de *surface plasmon resonance* (SPR) és probablement el millor mètode per analitzar la termodinàmica i la cinètica de la interacció entre dues proteïnes *in vitro* (Lalonde et al., 2008; Morsy et al., 2008). Aquest mètode aconsegueix monitoritzar interaccions entre proteïnes en temps real (Kamisaka et al., 2011; Rahman et al., 2011). El fenomen de SPR mesura el canvi de l'índex de refracció d'una solució al voltant d'una superfície que habitualment és una pel·lícula de partícules d'or. Aquests canvis en l'índex de refracció són deguts a la formació o la dissociació de complexos proteics.

En aquest mètode, la proteïna *bait* d'interacció és immobilitzada a la superfície d'un xip que està recobert de partícules d'or. La majoria de vegades, aquesta proteïna és una proteïna de fusió que conté epítips d'afinitat com per exemple una cua d'Histidines. El xip es posa a un aparell que mesura senyal de SPR en temps real mitjançant llum polaritzada. La llum és reflectida amb un determinat angle que depèn de la massa de proteïna que hi ha a la superfície del xip. Posteriorment, s'injecta a l'aparell una solució

que conté la proteïna *prey*. Si les proteïnes *bait* i *prey* interaccionen, la massa proteica de la superfície del xip canvia i fa canviar l'angle de refracció de la llum canviant la senyal SPR. Aquests canvis en la senyal SPR es poden monitoritzar en forma de sensograma (Figura 27). Finalment, es pot injectar una solució que dissocia el complex i observar novament els canvis en la senyal SPR.

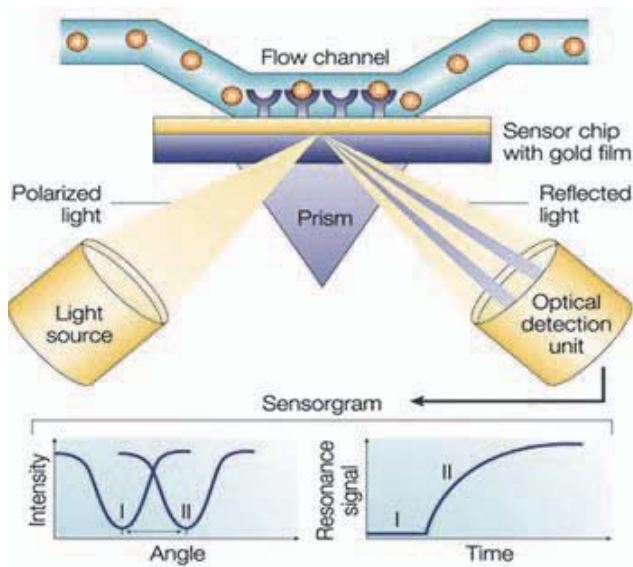


Figura 27. Representació del fenomen SPR. El fenomen SPR detecta canvis en l'índex de refracció de la llum en les immediacions de la superfície d'un xip sensor. El SPR es detecta com un canvi agut en l'índex de refracció de la llum amb un angle que depèn de la massa del material que hi ha a la superfície del xip. L'angle canvia (de I a II en el diagrama de sota a l'esquerra) quan les molècules s'associen a la superfície del xip. Aquest canvi pot ser monitoritzat de forma no invasiva a temps real mitjançant un sensograma de senyal de ressonància (que és proporcional al canvi de massa) respecte el temps. Imatge extreta de (Cooper, 2002).

A partir d'aquesta reacció reversible es poden estudiar les característiques d'associació i dissociació dels complexos proteics i les constants d'unió entre les dues proteïnes (Lalonde et al., 2008; Rahman et al., 2011). Aquesta tècnica permet obtenir informació quantitativa, com ara el grau d'especificitat de la unió entre les dues proteïnes, quina concentració de proteïna és present i activa en la interacció, la cinètica d'associació i dissociació de les proteïnes o com de forta és aquesta unió. Per altra banda, presenta dificultats a l'hora d'estudiar interaccions entre proteïnes de membrana ja que són més difícils de mantenir en solució. A més a més, es necessita la producció de grans quantitats de proteïna de fusió tant pel *bait* com pel *prey* mitjançant sistemes heteròlegs (Lalonde et al., 2008).

Amb aquesta tècnica s'han desenvolupat tecnologies comercials com el BIACORE que permeten l'anàlisi de múltiples *bait* i *prey* (Lalonde et al., 2008).

OBJECTIUS

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC) és una malaltia genètica per la qual no es coneix el mecanisme patològic i per tant, no existeix un tractament específic pels pacients. Per aquest motiu, l'objectiu general d'aquesta Tesi és avançar en la comprensió del possible mecanisme d'acció i la funció de la proteïna MLC1 i així aprofundir en el coneixement de la fisiopatologia de la malaltia.

Amb aquesta finalitat s'ha proposat la següent aproximació:

Identificació i anàlisi de l'interactoma de MLC1.

El desconeixement de la funció de MLC1 fa difícil entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Identificar i estudiar el conjunt de proteïnes que interaccionen amb MLC1 pot ajudar a trobar més informació sobre la possible funció que aquesta proteïna pugui desenvolupar. Per això, s'han proposat els següents objectius:

1. Desenvolupament del mètode Split-TEV per validar interaccions entre proteïnes de membrana.

És essencial disposar d'un mètode per detectar interaccions directes entre proteïnes. MLC1 és una proteïna de membrana i existeixen moltes dificultats a l'hora d'identificar interaccions entre proteïnes de membrana degut a les característiques intrínseques d'aquestes i de les tècniques que s'utilitzen. En aquest capítol es pretén desenvolupar el mètode de PCA Split-TEV, per obtenir una eina que permeti descriure interaccions entre proteïnes de membrana.

2. Anàlisi de les proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1.

El grup disposa d'una llista de proteïnes candidates a interaccionar amb MLC1 realitzada a partir d'estudis de genòmica i proteòmica. S'han dividit aquestes proteïnes en dos grups: proteïnes relacionades amb l'adhesió i proteïnes relacionades amb el transport a través de la membrana. En aquest capítol es vol realitzar la validació i l'anàlisi de la interacció entre MLC1 i les proteïnes candidates que tenen una funció relacionada amb el transport.

Durant el transcurs d'aquesta Tesi, estudis de col·laboració amb el grup de la Dra. Marjo van der Knaap de la Universitat d'Amsterdam han permès identificar *GLIALCAM* com a segon gen implicat en MLC. Posteriorment s'ha descrit que GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1 i com a subunitat auxiliar del canal de clorur CIC-2.

Aquest important descobriment ha fet que el grup focalitzi els esforços en l'estudi de GlialCAM i per això, s'han proposat dos nous objectius per aquesta Tesi:

3. Caracterització i desenvolupament de models cel·lulars per a l'estudi de MLC1 i GlialCAM a nivell bioquímic i funcional.

Per poder estudiar la fisiopatologia de MLC *in vitro*, el grup ha desenvolupat un model cel·lular basat en el cultiu primari d'astròcits de rata. Utilitzant aquest model cel·lular, s'ha posat en pràctica el model *knock-down* de la proteïna MLC1. En aquest capítol es pretén caracteritzar el model *knock-down* de MLC1 i generar i caracteritzar el model *knock-down* de la proteïna GlialCAM. Aquests estudis poden aportar nova informació sobre el mecanisme bioquímic de la fisiopatologia de la malaltia.

4. Estudis de la relació entre l'estructura i la funció de GlialCAM.

L'estudi de les regions o dominis de GlialCAM és bàsic per aprofundir en el coneixement del mecanisme funcional de la proteïna i com aquesta interacciona amb MLC1 o CIC-2. Per això, es vol portar a terme la caracterització bioquímica i funcional de la homo-interacció entre molècules de GlialCAM i de la hetero-interacció entre GlialCAM i MLC1 o CIC-2, mitjançant estudis d'interacció, localització i funció dels dominis identificats en GlialCAM.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Per ser utilitzat com a vector de clonació, un plàsmid ha de complir tres característiques com a mínim: 1) Tenir el seu propi origen de replicació i per tant autonomia de replicació respecte el genoma de l'hoste. 2) Tenir llocs de clonació múltiple que permetin l'obertura del DNA amb enzims de restricció i fer possible la clonació d'inserts de DNA amb una orientació determinada. 3) Posseir marcadors genètics seleccionables que permetin aïllar les cèl·lules hoste que continguin el vector. La majoria de plàsmids naturals no compleixen totes aquestes condicions, per tant la enginyeria genètica ha construït plàsmids artificials, combinant en una molècula diverses característiques provinents de plàsmids naturals.

1.1. OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA.

Per obtenir una quantitat suficient de DNA per diferents usos s'ha de poder amplificar. Per això, es parteix d'un DNA plasmídic purificat que conté l'insert d'interès i un gen de selecció de resistència a un antibiòtic. Com que aquest DNA té capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes, es sensibilitza aquestes cèl·lules sotmetent-les a un xoc tèrmic o elèctric i s'introdueix aquest DNA recombinant. Aquest procés es denomina *transformació*. Un cop s'han transformat els bacteris, es fan créixer en plaques de LB-agar que contenen l'antibiòtic al que només presenten resistència els bacteris que han incorporat el DNA plasmídic exogen. Els bacteris que s'han utilitzat habitualment durant aquesta Tesi són les soques DH5 α , DB3.1 i Stbl3 de *Escherichia coli*.

1.1.1. Mètode d'obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència.

L'electroporació és un mètode en el que les soques de *E.coli* són transformades a unes eficiències de l'ordre de 10^9 o 10^{10} transformants/ μg .

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca DH5 α .
- Medi LB o SOC.
- Glicerol al 10% (v/v) en aigua, autoclavat. S'ha d'utilitzar a 4°C.
- Tubs de centrifuga de 500 ml autoclavats. S'han d'utilitzar a 4°C.

METODOLOGIA

Tot el protocol es realitza en una campana de flux laminar o sota l'acció d'una flama *bunsen*.

1. Es raspa el glicerol de bacteris DH5 α i s'inoculen en 5 ml de LB sense antibiòtic de selecció. S'incuba a 37 °C en agitació durant tota la nit (12-16 hores).
2. Es dilueix el precultiu 1:100 (v/v) en 500 ml de LB fresc i s'incuba a 37°C en agitació fins arribar a una DO₆₀₀ de 0,5-0,7, moment en que els bacteris es troben en fase logarítmica de creixement.
3. S'atura el creixement bacterià incubant el cultiu 20 minuts en gel. (A partir d'aquí, tots els passos s'han de realitzar a 4°C).
4. Es transfereixen els bacteris als tubs de centrifuga de 500 ml (prèviament refredats) i es centrifuguen a 4000 g durant 15 minuts a 4°C.
5. S'elimina el sobrenedant per decantació. És molt important eliminar tot el sobrenedant, encara que es perdi una petita part dels bacteris.
6. Es resuspèn el *pellet* en 500 ml de glicerol 10% (prèviament refredat) i es centrifuga l'homogenat a 4000 g durant 15 minuts a 4°C. Seguidament es decanta el sobrenedant.
7. Es repeteix el procés efectuat en els passos 5 i 6 dues vegades, però aquest cop es resuspèn el *pellet* en un volum de 250 ml de glicerol 10%.
8. Després de decantar el sobrenedant, es resuspèn el *pellet* en 2 ml de glicerol 10%.
9. Finalment, es fan alíquotes de 50 μ l que són congelades en nitrogen líquid ràpidament i guardades a -80°C.

1.1.2. Transformació de bacteris.

1.1.2.1. Mètode per electroporació.

L'electroporació és una tècnica de transformació de bacteris que es basa en aplicar una descàrrega elèctrica per permeabilitzar la paret cel·lular bacteriana produint porus, els quals permeten l'entrada de DNA exogen. És necessari que el DNA a transformar estigui lliure de sals ja que interfereixen en l'eficiència del procés.

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca DH5 α .
- Medi LB o SOC.
- Cubeta d'electroporació de 0,1 cm (BioRad).
- Electroporador (BioRad Micropulser).
- Plaques de Petri amb medi LB-agar que contingui l'antibiòtic al que presenti resistència el plàsmid de DNA exogen.

METODOLOGIA

1. S'afegeixen 0,5-1 μ l del DNA a transformar en una alíquota de 50 μ l dels bacteris electrocompetents, mantenint-ho sempre en gel.

2. S'homogeneïtza la mostra i s'introdueix entre els dos elèctrodes d'una cubeta d'electroporació refredada prèviament.
3. S'aplica una descàrrega elèctrica de 375 V mitjançant el programa per bacteris de l'electroporador (BioRad Micropulser, en programa "Ec 1"). L'aparell ens dóna un valor de *time constant*, en mil·lisegons, que ofereix una idea del temps en que la mostra ha estat sotmesa al xoc elèctric. Quan més gran sigui el temps empleat, major quantitat de porus oberts trobem a la paret cel·lular, fet que possibilita millor l'entrada del DNA exogen al bacteri. Per tant, és un indicatiu de l'eficiència de transformació.
4. Es recupera la mostra afegint-hi 250 µl de LB o SOC sense antibiòtic i es passa a un tub.
5. S'incuba la mostra a 37°C en agitació durant 1 hora. Així es dóna temps a que el gen de resistència a l'antibiòtic que incorpora el plàsmid s'expressi.
6. Es sembren 150-200 µl de bacteris transformats en una placa de Petri que conté medi LB-agar amb l'antibiòtic de selecció.
7. Es deixa assecar la placa uns minuts a temperatura ambient i s'incuba en posició invertida a 37°C, durant tota la nit (12-16 hores). La resta de volum del cultiu es pot guardar a 4°C durant un màxim de 3-4 dies.

Paral·lelament s'efectua un control negatiu de transformació, en el que es sembren bacteris sense transformar amb DNA exogen.

8. Es piquen diverses colònies de la placa on s'han sembrat els bacteris transformats amb el DNA exogen, i es fan pre-cultius en 3-5 ml de LB amb l'antibiòtic de selecció. A les plaques del control negatiu de transformació no ha d'haver-hi creixement de colònies.
9. S'incuben els pre-cultius a 37°C tota la nit (12-16 hores), en agitació per poder efectuar l'extracció de DNA.

1.1.2.2. Mètode per xoc tèrmic (*Heat shock*).

El mètode per xoc tèrmic és una tècnica de transformació de bacteris on els porus que permeten l'entrada del DNA exogen són produïts per un canvi bruscat de temperatura. Les condicions generals del DNA a transformar són les mateixes que en el cas del mètode per electroporació.

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca Stbl3.
- Medi LB o SOC.

METODOLOGIA

1. S'inocula entre 50 i 100 ng de plàsmid recombinant per cada 100 µl de cèl·lules competents. La barreja es realitza en tubs de 15 ml o en *ependorfs* estèrils, agitant manualment amb suavitat.
2. S'incuba la barreja en gel durant 30 minuts.
3. S'incuba la barreja a 42°C durant 45 segons, produint així el xoc tèrmic.
4. Es transfereix immediatament en gel una altra vegada i es manté durant 2 minuts.
5. S'afegeix 900 µl de medi LB o SOC sense antibiòtic i s'incuba a 37°C, en agitació, durant 1 hora.

El procés de plaquejat, recollida de plaques i processat de les colònies s'efectua de la mateixa manera que en el cas anterior.

1.2. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DEL DNA PLASMÍDIC

Aquests processos consisteixen en extreure el DNA amplificat obtingut a partir del procés de transformació. Per això s'han utilitzat els equips comercials de *Qiagen* (*Qiagen Plasmid kit*), seguint els protocols del fabricant. Segons el volum del cultiu, es poden obtenir petites quantitats de DNA plasmídic, en el cas de les minipreparacions (0,3-0,6 µg/µl), o grans quantitats de DNA en el cas de les maxipreparacions (1-2 µg/µl). Aquests dos processos es basen en el mateix principi d'aïllament: lisi alcalina dels bacteris amb una posterior unió del DNA a una reïna d'intercanvi iònic. A més a més, s'han d'eliminar les impureses (lípidis proteïnes, RNA, DNA cromosòmic, etc.). Això s'aconsegueix mitjançant una sèrie de rentats de la reïna amb una solució de salinitat mitja que conté etanol. Finalment, el DNA purificat s'elueix amb aigua o un tampó de major salinitat.

1.2.1. Minipreparacions.

Aquest procediment es realitza seguint les instruccions de l'equip comercial *Qiagen Plasmid Mini Kit* (*Qiagen*).

MATERIALS I REACTIUS

- Es parteix d'un pre-cultiu de 3-5 ml de medi LB (12-16 hores a 37°C), que conté antibiòtic de selecció.
- Solució de resuspensió (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAsa A).
- Solució de lisi (200 mM NaOH, SDS 1%).
- Solució de neutralització (2,55 M acetat de potassi, pH 4,8).
- Columnes d'intercanvi iònic (*Qiagen*).
- Solució de rentat (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA. (Aquesta solució es barreja 1:1 amb etanol absolut).

- Aigua Milli-Q o tampó d'elució (TE) de salinitat alta.

METODOLOGIA

1. Es centrifuguen els 3-5 ml de precultiu a 4000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient i es decanta el sobrenedant.
2. Es resuspèn el *pellet* amb 250 µl de tampó de resuspensió, que conté RNAsa i que es manté a 4°C.
3. A aquest homogenat, s'hi afegeixen 250 µl de tampó de lisi i es barreja per inversió fins que la solució es torni de color blau.
4. S'afegeixen 350 µl de tampó de neutralització i s'homogeneïtza per inversió fins que la solució adquireixi una consistència densa de color blanc.
5. Es centrifuga l'homogenat a 13000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. El sobrenedant es transfereix a un tub acoblat a una columna que conté una reïna d'intercanvi iònic, i es manté en contacte amb la reïna durant 1 minut per obtenir una major recuperació de DNA.
7. Es centrifuga la columna durant 1 minut a 13000 rpm, de forma que el sobrenedant queda dipositat per gravetat en el fons del tub i el DNA queda acoblat a la reïna. Es desmunta la columna del tub i es descarta el sobrenedant.
8. Després de tornar a acoblar la columna al tub, s'afegeixen 750 µl de solució de rentat (amb etanol), i es repeteix el procés anterior. Posteriorment s'efectua una nova centrifugació sense afegir cap tampó, amb la finalitat d'eliminar restes d'etanol que degradin el DNA.
9. Finalment, s'acobla la columna a un tub *ependorf* nou i s'elueix el DNA, afegint 50 µl d'un tampó d'elució de salinitat alta (TE) o aigua Milli-Q, i es deixa reposar durant 1 minut.
10. Es torna a centrifugar durant 1 minut a 13000 rpm la columna, quedant dipositat el DNA en el fons del nou *ependorf*. En la majoria de casos, l'elució s'ha realitzat amb aigua Milli-Q, que ofereix una gran eficiència d'elució i el DNA no queda en una solució amb sals que pot ser un inconvenient en futurs processos.
11. El DNA extret es quantifica (apartat 1.2.4.) i es guarda a -20°C.

1.2.2. Maxipreparacions.

L'objectiu és el d'extreure grans quantitats del DNA transformat. Després de ser eluït, el DNA es concentra mitjançant una precipitació amb isopropanol. El procés s'ha dut a terme seguint les instruccions del *kit* comercial *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen).

MATERIALS I REACTIUS

- Un pre-cultiu de 3-5 ml, que serveix de *starter*, serà utilitzat per efectuar un salt d'escala, incubant-lo en 500 ml de cultiu líquid de LB amb l'antibiòtic de selecció a 37°C, en agitació durant 12-26 hores.
- P1: Tampó de resuspensió (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml de RNAsa A, que es manté a 4°C).
- P2: Tampó de lisi (200 mM NaOH, SDS 1%).
- P3: Tampó de neutralització (3M acetat de potassi, pH 5,5).
- QBT: Tampó d'equilibrat (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% etanol; 0,15% Tritó X-100).
- QC: Tampó de rentat (1M NaCl; 150 mM MOPS, pH 7; 15% etanol).
- QF: Tampó d'elució (1.25M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% etanol).
- Isopropanol.
- Etanol al 70%.
- Tubs de centrifuga de 500 ml autoclavats.
- Aigua Milli-Q o tampó d'elució (TE) de salinitat alta.

METODOLOGIA

1. Es centrifuga el cultiu de 500 ml a 6000 g, durant 15 minuts a 4°C i s'elimina el sobrenedant.
2. Es resuspèn el *pellet* amb una pipeta *Pasteur* de plàstic, en 10 ml de tampó P1, que conté RNAsa i es manté a 4°C.
3. S'afegeixen 10 ml de tampó P2, es barreja per inversió i s'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts. És important que el temps d'incubació no sigui major de 5 minuts.
4. S'afegeixen 10 ml de tampó P3 i es barreja per inversió (de 4 a 6 cops) fins que la consistència es torni densa i d'un color blanc.
5. Es transfereix el lisat a les columnes especials *Quiafilter Cartridges* (Quiagen) i s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient (sense inserir l'èmbol).
6. Durant els 10 minuts d'incubació, s'equilibra la columna que conté la reïna d'intercanvi iònic (*Qiagen*-tipus 500), efectuant 2 rentats de 10 ml amb el tampó QBT, deixant que passi per la columna per gravetat.
7. Després de l'equilibrat i la incubació, es treu la tapa de la columna *Quiafilter Cartridge* i s'insereix l'èmbol (sense pressionar). El líquid filtrat es fa passar per la columna *Qiagen*-tipus 500 prèviament equilibrada, de forma que el sobrenedant es deixa caure per gravetat i el DNA queda retingut a la reïna.
8. S'efectuen dos rentats, per gravetat, de la columna amb 30 ml de tampó QC.

9. L'elució del DNA es porta a terme afegint 15 ml de tampó QF i recollint el sobrenedant en un tub de 30 ml especial per ser centrifugat a altes velocitats.
10. El volum recollit es precipita amb 0,7 volums d'isopropanol a temperatura ambient i es centrifuga a una velocitat superior a les 15000 g durant 30 minuts a 4°C.
11. S'elimina el sobrenedant cuidadosament, i el *pellet* es renta amb 5 ml d'etanol al 70% (sense resuspendre) i es centrifuga novament a una velocitat superior a les 15000 g durant 10 minuts a 4°C.
12. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecar el *pellet* a temperatura ambient entre 5 i 10 minuts.
13. Es resuspèn el *pellet* (DNA plasmídic) amb un volum d'entre 100 i 200 µl (depenent de la mida del *pellet*) de tampó TE o aigua Milli-Q i es transfereix a un *eppendorf*.
14. Finalment es quantifica el DNA (apartat 1.2.4.) i es guarda a -20°C.

1.2.3. Precipitació del DNA.

El procés de precipitació del DNA s'utilitza tant per purificar el DNA com per concentrar-lo. A la mostra de DNA s'hi afegeix 3 cops el seu volum, d'etanol al 95% o isopropanol (també s'hi pot afegir una concentració 1/10 d'acetat de sodi 3M). S'incuba durant 30 minuts a -80°C per afavorir la precipitació. Posteriorment, es centrifuga a 13300 rpm 30 minuts a 4°C i, després de descartar el sobrenedant amb molta cura per no perdre el *pellet*, s'efectuen 2-3 rentats amb etanol al 70%, centrifugant 5 minuts a 13300 rpm a 4°C. Finalment es decanta el sobrenedant i es deixa assecar el *pellet*. El DNA es resuspèn amb aigua Milli-Q i és convenient deixar-lo a 4°C abans de quantificar-lo. Posteriorment es guarda a -20°C.

1.2.4. Quantificació del DNA.

Els àcid nucleics tenen un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet la seva quantificació i validació del grau de puresa. El DNA extret (o RNA) es quantifica mitjançant un espectrofotòmetre, a una densitat òptica de 260 nm, realitzant un perfil d'absorbància entre 220 i 320 nm. El DNA o RNA purificats presenten una corba típica, amb el seu màxim a 260 nm, punt que es mesura per extrapolar la concentració de la mostra.

La mostra de DNA (1-2 µl) es passa per l'espectrofotòmetre (*Nano-Drop*), que dona l'absorbància a 260 nm, la qual correspon a 50 µg/ml de DNA o 40 µg/ml de RNA i la concentració en µg/µl .

La fórmula a aplicar es la següent:

$$C = \text{ABS260} \times 50 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times \text{FD (per DNA)}$$

$$C = \text{ABS260} \times 40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times \text{FD (per RNA)}$$

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

És convenient utilitzar una mostra "blanc", que contingui únicament el tampó on hi ha la mostra, com a calibratge previ de la mesura.

1.2.5. Seqüenciació del DNA.

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

MATERIALS I REACTIUS

- Termociclador (Applied Biosystems).
- Seqüenciador ABI3730.
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.
- Tampó de seqüenciació 5X (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit).
- Construcció de DNA que conté el gen d'interès.
- *Primer* corresponent a 1 μM . Consisteix en una seqüència d'oligonucleòtids que es troba a certa distància a 5' o 3' del gen que es vol seqüenciar. És recomanable efectuar varies reaccions de seqüència per un mateix gen, de manera que s'obtinguin un mínim de dues seqüències per cada regió del gen.

METODOLOGIA

1. En un tub de PCR es barregen 0,5-1 μg de DNA, 1 μl de *BigDye*, 1 μl de tampó de seqüenciació, 3,2 μl de *primer* i aigua Milli-Q fins a un volum final de 10 μl . La *BigDye* és l'últim reactiu que s'afegeix.
2. La reacció de PCR s'efectua en les condicions següents:

Desnaturalització a 96°C 10 segons	}	25 cicles
Hibridació a 50°C 5 segons		
Elongació a 60°C 4 minuts		

3. Finalitzada la reacció de PCR, s'afegeixen 10 μl d'aigua Milli-Q i s'envia a seqüenciar als Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona.

1.3. CLONATGE DE DNA PLASMÍDIC.

Les diferents tècniques de biologia molecular actuals permeten la manipulació i modificació de fragments de DNA amb relativa facilitat. Avui en dia, és relativament

fàcil i ràpid dissenyar i construir vectors específics per a una aplicació o assaig experimental concret.

Durant el present treball s'han desenvolupat diferents tècniques de clonatge per inserir els gens d'interès en vectors d'expressió en bacteris i cèl·lules eucariotes, vectors adenovirals, miRNAs, proteïnes de fusió, etc. S'ha utilitzat la tècnica de clonació clàssica mitjançant l'ús d'enzims de restricció, la clonació per recombinació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen) i la clonació de mutants mitjançant la reacció de PCR recombinant.

1.3.1. Reacció de PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa o de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un sistema *in vitro* que permet l'amplificació selectiva de fragments de DNA de doble cadena de manera exponencial, utilitzant una polimerasa termostable i oligonucleòtids encebadors (*primers*) específics pel fragment de DNA a amplificar (Saiki et al., 1988).

Consisteix en cicles successius de desnaturalització de la doble cadena del DNA, hibridació de la cadena senzilla amb oligonucleòtids encebadors que posseeixen una seqüència complementària a la que es pretén amplificar i extensió de les cadenes d'oligonucleòtids mitjançant una polimerasa termostable.

En cada cicle, idealment, es dobla el nombre de còpies del fragment de DNA, per tant, s'obté una amplificació exponencial a partir d'un nombre inicial baix de còpies.

Cada fragment de DNA a amplificar presenta unes característiques diferents, igual que els *primers* i la polimerasa. Per aquest motiu, és convenient optimitzar les condicions per cada fragment en particular.

El correcte disseny dels oligonucleòtids encebadors és un punt clau per obtenir una correcta PCR. Per tant, existeixen una sèrie de criteris que s'han de tenir en compte a l'hora de dissenyar-los:

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

dímers, especialment si aquests presenten una estructura tal que deixin extrems 5' protuberants.

A continuació es mostra la reacció de PCR optimitzada per la *KOD Hot Start DNA polymerase* (Novagen):

Tampó Polimerasa (10X)	5 µl
dNTPs (2 mM cadascun)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
Oligonucleòtid F (<i>forward</i>) (10 µM)	1.5 µl
Oligonucleòtid R (<i>reverse</i>) (10 µM)	1.5 µl
DNA motlle (100 ng/µl)	2 µl
DNA Polimerasa (KOD polimerasa 1 U/µl)	1 µl
Aigua Milli-Q	31 µl
Volum final	50 µl

La reacció de PCR es fa en tubs de 0,2 o 0,5 ml i s'incuba en un termociclador amb un programa predeterminat. Quan es realitza una primera PCR cal optimitzar el procés, variant els diferents paràmetres de la reacció.

Les condicions òptimes d'utilització de la *KOD Hot Start DNA polymerase* en el laboratori són les següents:

Inici: 2 minuts a 95°C	} 25 cicles
Desnaturalització: 30 segons a 95°C	
Hibridació: 30 segons a 55°C	
Elongació: 1 minut i 30 segons a 70°C	
Elongació final: 10 segons a 70°C	
Finalment es deixa a 4-16°C	

Els temps d'elongació depenen de la longitud del fragment a amplificar (generalment 1 min per 1 kb) i la temperatura d'hibridació depèn de la seqüència de l'encebador, i es calcula en °C, mitjançant la següent fórmula:

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

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

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

Aquest tipus de PCR ens permet introduir mutacions puntuals al DNA, insercions i delecions relativament llargues.

La tècnica consisteix en realitzar 2 fragments de PCR que contenen la mutació.

Aquests dos fragments contenen una regió de solapament que és igual i que conté la mutació d'interès, això permet fer-los servir com a motlle per la següent PCR de recombinació, fent servir els oligonucleòtids encebadors dels extrems 5' i 3'. La

mutació que es vol generar s'introdueix a l'oligonucleòtid, fet que fa que la seqüència no sigui totalment complementaria a la seqüència del DNA motlle. És per això que s'ha d'ajustar les condicions de la PCR. En aquest cas s'ha reduït el número de cicles a 25 per disminuir la probabilitat de generar mutacions i s'ha partit d'una gran quantitat de DNA com a motlle. En algunes ocasions també s'ha fixat la temperatura d'hibridació a 55°C o s'ha afegit el 10% de DMSO per millorar les condicions d'hibridació.

En dos tubs de PCR s'elaboren les dues PCRs parcials (PCR1 i PCR2) tal i com s'explica a l'apartat 1.3.1., posteriorment es valida la mida del fragment en un gel d'agarosa i es purifica (apartats 1.3.3.2. i 1.3.3.3.). Les dues PCRs s'utilitzen com a motlle per la PCR recombinant.

La reacció de PCR recombinant optimitzada per la *KOD Hot Start DNA polymerase* és la següent:

Tampó Polimerasa (10X)	10 µl
dNTPs (2 mM cadascun)	10 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
Oligonucleòtid F (<i>forward</i>) (10 µM)	3 µl
Oligonucleòtid R (<i>reverse</i>) (10 µM)	3 µl
PCR 1	5 µl
PCR 2	5 µl
DNA Polimerasa (KOD polimerasa 1 U/µl)	2 µl
Aigua Milli-Q	66 µl
Volum final	100 µl

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

Finalment es procedeix a clonar el fragment en el vector d'interès ja sigui per el mètode clàssic o per el sistema *Gateway*.

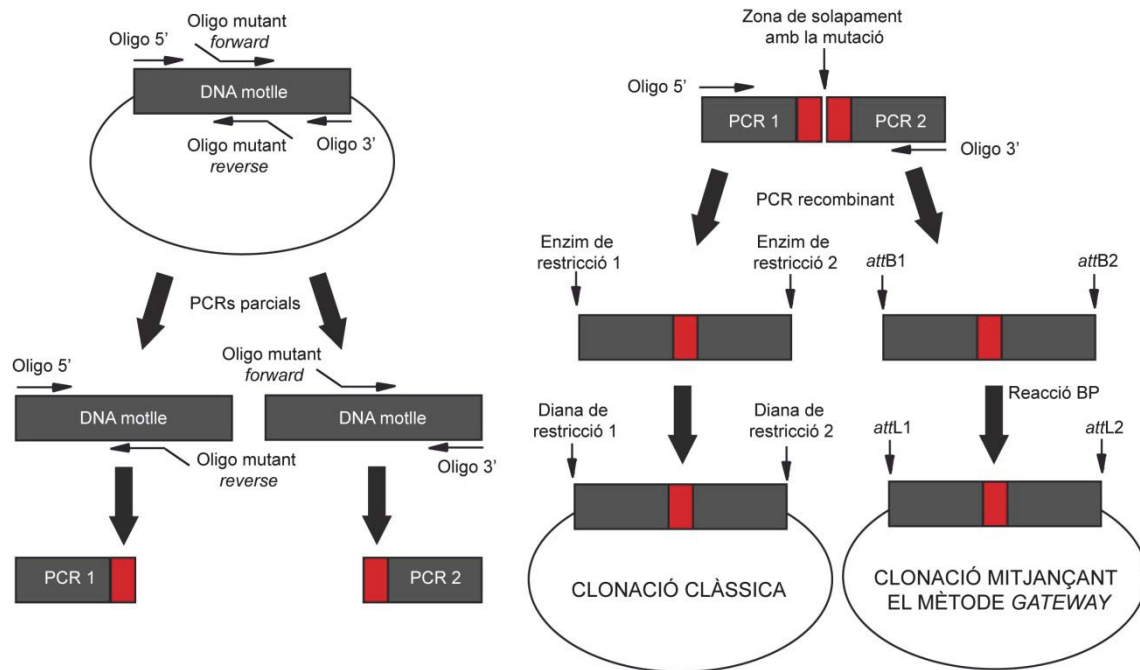


Figura 28. Esquema gràfic del mètode de mutagènesi per PCR recombinant. En primer lloc s'efectuen dos PCRs parcials: en una (PCR1) s'utilitza un oligonucleòtid encebador (oligo) *forward* a 5' del lloc on volem introduir la mutació i un *reverse* que contingui la mutació. La segona (PCR2) s'obté a partir d'un oligonucleòtid *forward* amb la mutació i un *reverse* a 3' del lloc on volem introduir la mutació. Les dues PCRs presenten una regió de solapament (en vermell), que conté la mutació. A continuació, les PCRs parcials s'amplifiquen amb la PCR recombinant, utilitzant els oligonucleòtids dels extrems 5' i 3', obtenint el fragment d'interès amb la mutació introduïda. Aquest fragment pot ser digerit pels seus extrems amb la finalitat de ser clonat al vector d'expressió pel mètode clàssic o bé recombinat amb un vector donador mitjançant la BP clonasa, per generar un vector d'entrada utilitzant la metodologia Gateway.

1.3.3. Clonació clàssica.

Aquest mètode permet inserir un gen d'interès (insert) en un vector d'expressió determinat. Això s'aconsegueix mitjançant la digestió tant del vector com de l'insert de manera que els seus extrems siguin compatibles i posteriorment puguin ser lligats o fusionats.

1.3.3.1. Digestió amb enzims de restricció.

El clonatge amb enzims de restricció es basa en la característica que tenen aquestes endonucleases de tallar el DNA en dianes específiques, generant extrems (cohesius o roms) que poden ser relligats en el vector d'interès mitjançant un enzim de lligació.

La digestió del DNA amb enzims de restricció s'ha efectuat seguint les instruccions de la casa comercial que els ha proporcionat (New England Biolabs). Pel que fa als enzims, s'han utilitzat de 1 a 10 U/ μ g de DNA, i mai sense superar el 10% del volum final de la reacció, ja que una concentració superior al 5% inhibeix l'activitat enzimàtica. Normalment les digestions s'han efectuat a 37°C (a excepció dels enzims que requerien altres temperatures), durant 1-16 hores, depenent de l'eficiència de la

reacció de digestió i de la quantitat de DNA. En el cas d'efectuar una digestió per a una clonació, es digereix 10 µg de DNA i la reacció es deixa 16 hores (tota la nit).

Es poden efectuar digestions dobles en el cas que la compatibilitat dels dos enzims ho permeti. Si no es així, cal efectuar primer una digestió, córrer la mostra en un gel d'agarosa, tallar la banda i purificar-la per realitzar la segona digestió posteriorment.

1.3.3.2. Electroforesis de DNA en gels d'agarosa.

Per validar la integritat d'un DNA, la qualitat d'una digestió i els fragments generats, així com per a la purificació de fragments d'interès, es realitza l'electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants de manera que els fragments separats siguin de DNA de doble cadena. La migració d'aquests fragments és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. Juntament amb el DNA d'estudi es carreguen marcadors de pes molecular conegut per tal d'identificar els diferents fragments de DNA.

MATERIALS I REACTIUS

- Cubeta d'electroforesis.
- Font de corrent elèctrica.
- TAE 50X (Tampó Tris-acetat) (2M Tris-base, 1M àcid acètic, 50 mM EDTA). Es guarda a temperatura ambient i s'utilitza a 1X.
- Tampó de càrrega 5x (40 mM EDTA, 0,1% SDS, 30% Ficol 400, 0,2% blau de bromofenol). Es guarda a -20°C i s'utilitza a 1X.
- Gel d'agarosa: La concentració d'agarosa varia segons la mida de les bandes de DNA a visualitzar, normalment es prepara l'agarosa a l'1-2% en tampó TAE 1X. Al gel s'hi afegeix bromur d'etidi a una concentració aproximada de 1 µg/ml.
- Marcadors de pes molecular.

METODOLOGIA

1. Les mostres de DNA es preparen amb el tampó de càrrega a una concentració final 1X. En el cas que es pretengui testar la correcta digestió d'un fragment de DNA, es prepara entre 1-2 µg de mostra carregada i s'intenta que el volum final (DNA, tampó de càrrega i aigua estèril) sigui de 10-12 µl.
2. Es prepara el gel amb agarosa a l'1-2% amb TAE 1X i es fa bullir al microones fins que l'agarosa es dissolgui completament. Es deixa temperar i s'afegeix el bromur d'etidi. Es barreja tot i es posa a la cubeta on prèviament s'ha posat una pinta.
3. Una vegada polimeritzat el gel, es col·loca en la cubeta d'electroforesis, es cobreix completament de tampó d'electroforesis (TAE 1X), s'extreu la pinta i es carreguen les mostres juntament amb el marcador de pes molecular. La migració es produirà des del pol negatiu al positiu ja que el DNA té càrrega negativa degut a la

presència de grups fosfat. Es sotmet el gel a un voltatge que varia entre 60 i 110 V, controlant el front de migració.

4. Finalitzada la migració, les bandes es visualitzen en un trans-il·luminador de llum ultraviolada i se'n fa una fotografia.

1.3.3.3. Purificació del DNA.

Sovint es necessita purificar fragments de DNA digerit de plàsmids o PCRs per tal d'efectuar un clonatge. Per això, primer cal realitzar una electroforesis en gel d'agarosa, i a continuació aïllar la banda d'interès per després purificar-la.

Per aconseguir una bona purificació s'ha de carregar una gran quantitat de DNA en el gel (normalment tota la digestió o tota la PCR), ja que una gran part del DNA es perd durant el procés de purificació.

La mostra es deixa migrar suficientment de manera que la banda d'interès estigui prou separada de la resta. A continuació, es talla la banda amb un bisturí, sota la llum ultraviolada de manera que es visualitzin els fragments de DNA, i es diposita en un tub *ependorf* per a ser purificada.

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

MATERIALS I REACTIUS

- Columnes acoblades a tubs de 2 ml.
- Tampó de captura.
- Tampó de rentat (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA). S'ha d'afegir etanol.
- Aigua Milli-Q o tampó TE.

METODOLOGIA

1. S'afegeixen entre 400-500 µl de tampó de captura (en funció de la mida d'agarosa tallada) i s'incuba a 60°C durant 5-15 minuts, fins que es dissolgui completament l'agarosa.
2. Es transfereix la mostra a una columna acoblada a un tub de 2 ml i s'incuba durant 1 minut a temperatura ambient.
3. Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut a temperatura ambient i es retira el sobrenedant.
4. S'afegeixen 500 µl de tampó de rentat i es centrifuga novament a 13000 rpm durant 1 minut.

5. S'efectua un altre rentat de la columna amb 250 µl del mateix tampó i es torna a centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut.
6. S'elimina el sobrenedant i es transfereix la columna a un tub *ependorf* de 1,5 ml. S'elueix el DNA purificat amb 50 µl de tampó d'elució o aigua Milli-Q.

1.3.3.4. Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina.

El tractament amb fosfatasa alcalina té com a objectiu eliminar els grups 5'-fosfat del vector de DNA digerit. D'aquesta manera el vector no es pot relligar augmentant l'eficiència de lligació amb l'insert, que té els seus propis grups 5'-fosfat lliures.

S'ha utilitzat la fosfatasa alcalina de la casa comercial Roche. S'afegeixen 2 µl de fosfatasa alcalina a un volum total de 50 µl de vector digerit (barreja de vector digerit, enzims de restricció i tampó de digestió) i s'incuba la mostra durant 30 minuts a 37°C. Seguidament es du a terme una electroforesis i una purificació del vector digerit i de l'insert de la mateixa manera que s'explica als apartats anteriors.

1.3.3.5. Lligació.

El procés de lligació és el procés pel qual el vector (digerit, purificat i defosforilat) i l'insert passen a fusionar-se. La reacció de lligació està catalitzada per l'enzim T4-DNA lligasa que catalitza la formació d'un enllaç fosfodiéster entre l'extrem 5' fosfat i el 3' hidroxil en un DNA de doble cadena. Aquesta reacció finalment es transforma en bacteris competents i s'han d'efectuar els següents controls:

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

Una lligació ha funcionat bé quan creixen moltes més colònies en la lligació problema que en el control negatiu de lligació, i cap en el control negatiu de transformació.

L'èxit d'una lligació depèn de diversos factors que s'han de tenir en compte, com ara la qualitat i la quantitat del DNA utilitzat, la forma dels extrems que han generat els enzims de restricció (millor extrems cohesius que roms), la relació molar entre el vector i l'insert, el grau de fosforilació del vector i el mètode de transformació.

Normalment, el procés de lligació s'efectua en un volum final de 10 µl. La relació insert:vector es pot variar en funció de la llargada d'ambdós i segons la fórmula:

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

Habitualment s'han utilitzat les següents proporcions: 6 µl d'insert, 2 µl de vector, 1 µl de T4 DNA-lligasa (New England Biolabs), i 1 µl de tampó de lligasa 10x.

La reacció es deixa incubar a 18°C durant tota la nit i al dia següent es transforma en bacteris, s'extreu el DNA i es comprova per digestió i seqüenciació.

1.3.4. Clonació per recombinació mitjançant el sistema Gateway (Invitrogen).

El sistema Gateway d'Invitrogen és un mètode de clonatge basat amb el sistema de recombinació de lloc específic del *fag lambda* (Landy, 1989). Aquest sistema proporciona una manera més ràpida i eficient de transferir una seqüència de DNA a diferents vectors comparada amb el sistema clàssic de clonatge mitjançant enzims de restricció, degut a que evita els passos de digestió, purificació i lligació optimitzant el temps de clonatge. El sistema permet la transferència d'un insert d'un vector a un altre mitjançant la utilització d'un vector d'entrada (*Entry Clone*) capaç de recombinar amb tota una gamma de vectors destí, ja siguin d'expressió bacteriana, de mamífer, lentivirals, adenovirals, etc., com es representa de forma esquemàtica en la **Figura 29**.

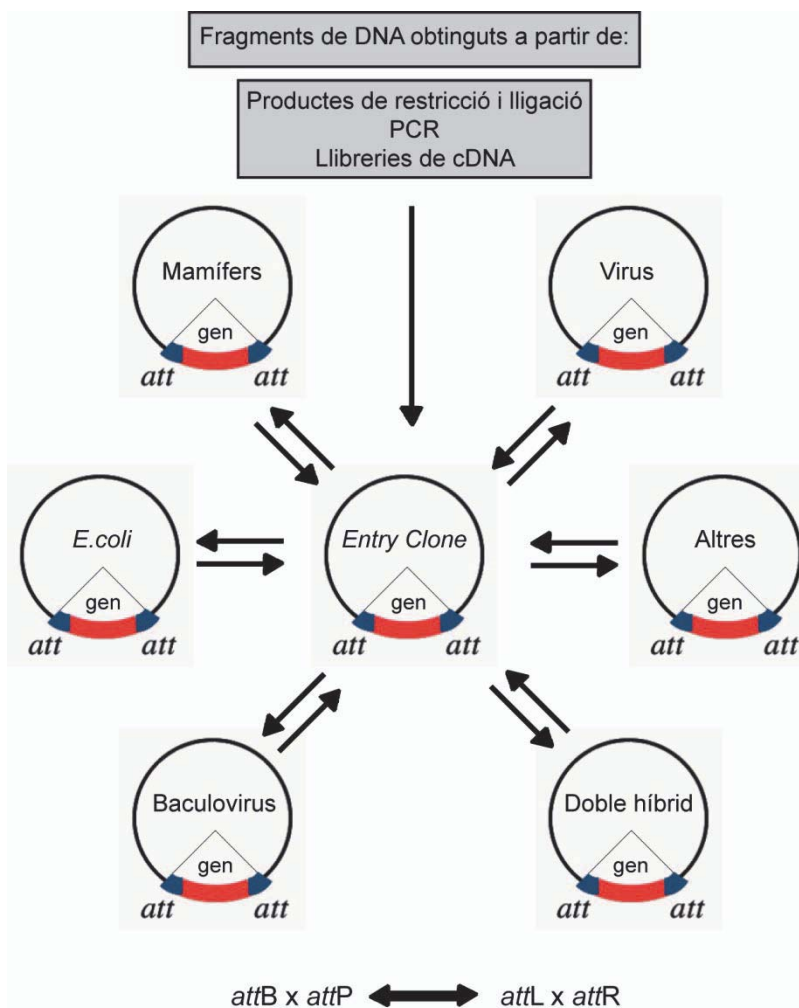


Figura 29. Flexibilitat del sistema de recombinació Gateway. Sistema ràpid i senzill en el que un insert d'interès pot ser clonat per recombinació a qualsevol vector d'expressió a partir d'una construcció intermediària (*Entry clone*). La transferència del DNA (provinent d'una PCR, lligació, etc.) a un vector, o d'un vector a un altre es produeix per recombinació homòloga gràcies a les zones de recombinació *atts*.

1.3.4.1. Clonatge amb el sistema Gateway simple.

El sistema *Gateway* està basat en el cicle biològic del *fag lambda* i en el seu sistema de recombinació en *E.coli*. En el *fag lambda* la seqüència de recombinació és *attP* (243 pb), mentre que en *E.coli* és *attB* (25 pb). La reacció d'integració consisteix en la recombinació *attB* x *attP*, mitjançant proteïnes integrasa (Int) del *fag* i el factor d'integració de l'hoste (*Host Integration Factor, HIF*). Com a resultat d'aquesta reacció es creen dues noves seqüències de recombinació, *attL* i *attR*, flanquejant el profag recombinat, sense la pèrdua de seqüència de DNA. La reacció pot donar-se de forma inversa durant el procés d'escissió. Quan *attL* i *attR* recombinen (reacció efectuada pel HIF i la proteïna fàgica Escisionasa (Xis)), el λ -DNA s'escindeix del genoma de *E.coli*, regenerant les seqüències *attB* (en *E.coli*) i *attP* (en el *fag*). En resum, la reacció és específica i bidireccional: ***attB* x *attP* ↔ *attL* x *attR***

Seguint el protocol del proveïdor (Invitrogen), el primer pas és dissenyar els oligonucleòtids que permetin introduir les seqüències *attB1* i *attB2* als extrems del fragment de DNA d'interès mitjançant una reacció de PCR. Una vegada s'aconsegueix flanquejar el fragment amb les seqüències *atts*, s'efectua la reacció de recombinació entre el fragment de PCR i un vector donador. Aquest vector donador (en el nostre cas **pDONR221**) conté les seqüències *attP1* i *attP2* i s'utilitza per clonar el producte de PCR que conté el gen d'interès, flanquejat per *attB*, i generar els clons d'entrada o *Entry Clones*. El pDONR conté el gen de resistència a kanamicina i el gen de selecció negativa *ccdB*, el qual interfereix amb la DNA girasa de *E.coli* (Bernard and Couturier, 1992), inhibint el creixement de la majoria de soques de *E.coli*.

Un *Entry Clone* (**pENTR**-gen d'interès), generat pel procés de recombinació entre el fragment de PCR i el vector donador (*attB* x *attP*), és un vector resistent a kanamicina, on el gen d'interès (flanquejat per seqüències *attL1* i *attL2*) ha eliminat el gen *ccdB*.

Un cop obtingut el clon d'entrada, podem clonar el nostre insert a qualsevol vector destí (**pDEST**), que presenta resistència a ampicil·lina, conté el gen *ccdB* i presenta les seqüències de recombinació *attR1* i *attR2*.

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

1.3.4.2. Reacció *attB* x *attP*. Construcció de *Entry Clones*.

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

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

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

Les quatre guanines (G) afegides a l'extrem 5' de cada oligonucleòtid augmenten l'eficiència de la recombinasa. A continuació s'introdueix la seqüència *attB1* i abans d'introduir el gen d'interès, s'afegeix la seqüència *Kozak* (ACC) abans del codó d'inici del gen (ATG). Això facilita el reconeixement de la seqüència d'iniciació (AUG) durant el procés de traducció. Seguidament s'afegeixen entre 18 i 25 pb del gen d'interès. A la seqüència *attB2* s'afegeix un codó d'aturada de la traducció del gen d'interès (*stop*). La reacció de recombinació entre el gen d'interès flanquejat per *attBs* i el pDONR (flanquejat per *attPs*) es du a terme mitjançant l'enzim recombinasa **BP clonasa II**, obtenint l'*Entry Clone* (*attL1* i *attL2*). En un tub *ependorf* de 1,5 ml, s'ajunten els següents reactius (reacció optimitzada):

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

La reacció s'incuba a 37°C entre 2-12 hores i s'atura afegint 0,5 µl de solució de proteïnasa K i incubant a 37°C durant 10 minuts. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α per electroporació i es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar que contenen 50 µg/ml de kanamicina. Un cop extret el DNA i comprovat per digestió i seqüenciació, es procedeix amb el protocol.

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

La recombinació entre un *Entry Clone*, que conté les seqüències *attL*, i el vector destí, amb seqüències *attR*, es fa mitjançant la **LR clonasa II**. En un tub *ependorf* de 1,5 ml s'ajunten els següents reactius:

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

La reacció s'incuba a 25°C entre 2 hores i fins tota la nit i s'atura afegint 0,5 µl de proteïnasa K durant 10 minuts a 37°C. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α per electroporació d'igual forma que amb els *Entry Clones*. Es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar que contenen ampil·lina a 100 µg/ml. Els vectors resultants són comprovats per digestió i seqüenciació.

1.3.4.4. Clonatge amb el sistema Gateway *MultiSite* de 2 fragments.

El sistema *Gateway* permet construir vectors d'expressió de manera ràpida i eficient a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA gràcies al sistema *Multisite*. Aquesta tecnologia utilitza la recombinació específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en l'ordenació i orientació correctes. S'usa l'equip comercial *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination* (Invitrogen). La diferència entre el sistema *Multisite* i el simple es troba en les seqüències *atts*. En el cas de voler clonar dos fragments, en un fragment de DNA s'introdueix per PCR les seqüències *attB1* i *attB5r* i en l'altre fragment les seqüències *attB5* i *attB2*. Aquests dos fragments de DNA es clonen en els seus vectors donadors pDONR221 P1-P5r i pDONR221 P5-P2 respectivament, per generar dos *Entry Clones* els quals es podran recombinar amb el vector destí d'interès (mitjançant l'enzim **LR clonasa II plus**) generant el vector d'expressió desitjat (**Figura 30**).

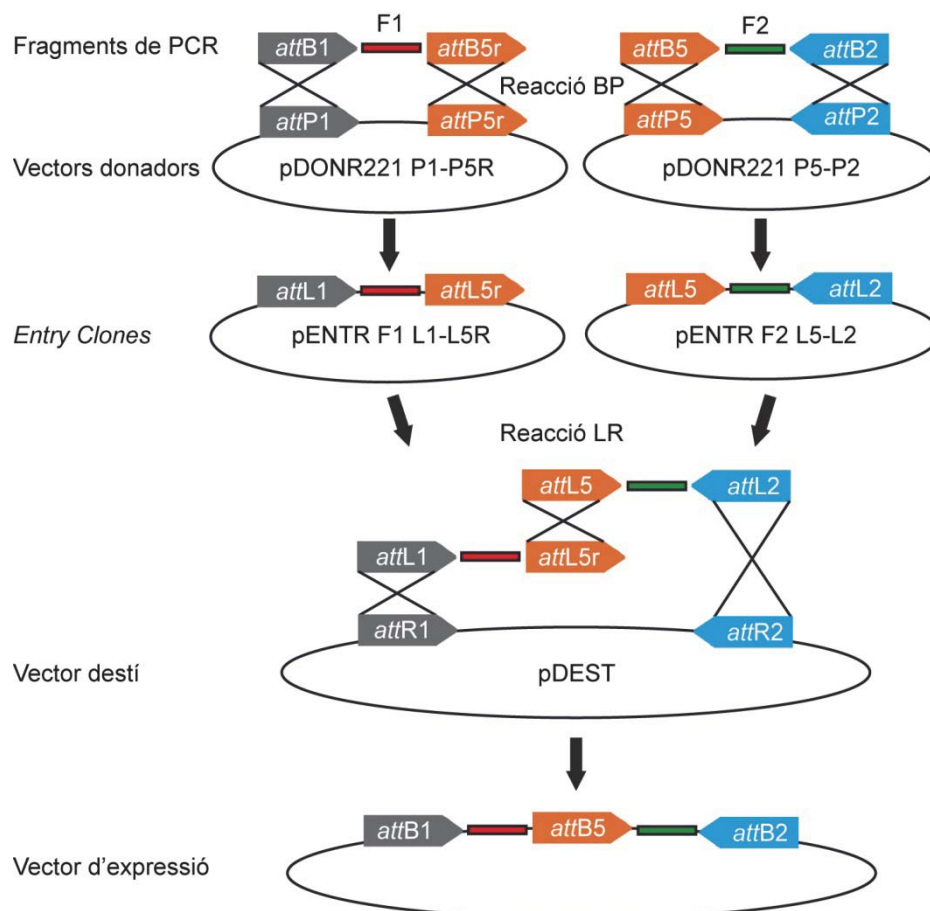
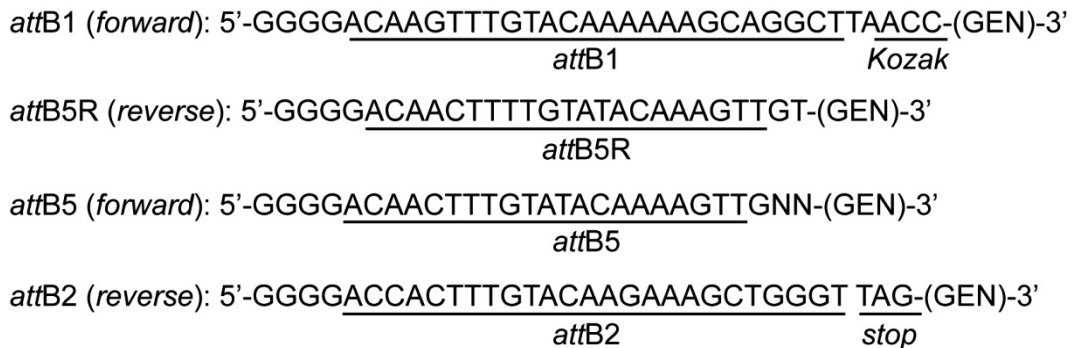


Figura 30. Esquema de la reacció de recombinació Gateway *Multisite* de 2 fragments. Es pretén clonar el fragment 1 (F1) en vermell, seguit del fragment 2 (F2) en verd. Mitjançant PCRs es flanquegen els fragments amb els diferents *attBs*, que poden ser recombinats amb els vectors donadors (pDONR) corresponents, per la reacció de la BP clonasa II i així obtenir els respectius *Entry Clones*. Aquests, es poden recombinar entre ells i amb el vector destí (pDEST) mitjançant la reacció de la LR clonasa II plus. Així s'obté un vector d'expressió amb els dos fragments d'interès en l'ordre i la direcció correctes.

En aquest sistema, els *Entry Clones* i els vectors destí presenten les mateixes característiques que en el sistema simple explicat anteriorment.

Els oligonucleòtids encebadors utilitzats són:



S'ha de tenir en compte que si es vol clonar 2 fragments de DNA per generar una proteïna de fusió, al primer fragment se li ha d'eliminar el codó *stop* quan s'introdueixen les seqüències *attBs* per PCR (en el cas del *attB5R*), ja que si no és així només s'expressarà una de les dues proteïnes (la primera). La reacció de LR està optimitzada per les següents relacions:

Vector Destí	20 fmols
<i>Entry Clone</i> 1	10 fmols
<i>Entry Clone</i> 2	10 fmols
Aigua Milli-Q	fins a 5 µl de volum final
LR clonasa II plus	1 µl

On els fmols de DNA es converteixen en ng utilitzant la fórmula:

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

on x és el número de fmols i N la mida del DNA en parells de bases (pb). La reacció s'incuba a 25°C tota la nit i s'atura afegint 0,5 µl de proteïnasa K, a 37°C durant 10 minuts. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α com en el sistema simple.

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

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

1.3.5. Generació de miRNAs

Els microRNAs (miRNA) són unes molècules petites de 20-25 nucleòtids que, igual que el RNA missatger (mRNAs), estan transcrits per gens, però la diferència és que no codifiquen per proteïnes. La seva funció és la de regular l'expressió gènica, ja sigui prevenint la traducció del mRNA a proteïna o induint la degradació del mateix mRNA. S'han identificat aproximadament 700 miRNAs en el genoma humà i la seva desregulació en l'expressió està implicada en varies malalties.

Els miRNAs es transcriuen a partir d'un gen, d'un intró o d'una regió promotora, mitjançant la RNA polimerasa II, obtenint un miRNA primari (pri-miRNA) de doble cadena i amb una estructura en forma de pinça (*hairpin*). El pri-miRNA és processat al nucli per l'endonucleasa Drosha/Rnasa III que talla les dues cadenes de RNA alliberant un miRNA d'entre 60-70 nucleòtids anomenat pre-miRNA. Aquest pre-miRNA és transportat al citoplasma on és processat per l'enzim Dicer (Rnasa III, endonucleasa) que talla el RNA de doble cadena generant el miRNA madur. Aquest miRNA madur s'incorpora al complex RISC (Silenciament induït per RNA) on es dirigeix la repressió de l'expressió dels gens per dues vies:

- 1) Si la complementació entre el miRNA i el mRNA és perfecta, el complex RISC talla el mRNA i aquest és degradat.
- 2) Si la complementació no és perfecta, el complex RISC reprimeix la traducció del mRNA. El tall del mRNA no causa cap modificació en el miRNA i això permet que aquest pugui reconduir el complex RISC per reprimir l'expressió d'altres missatgers (Bartel, 2004).

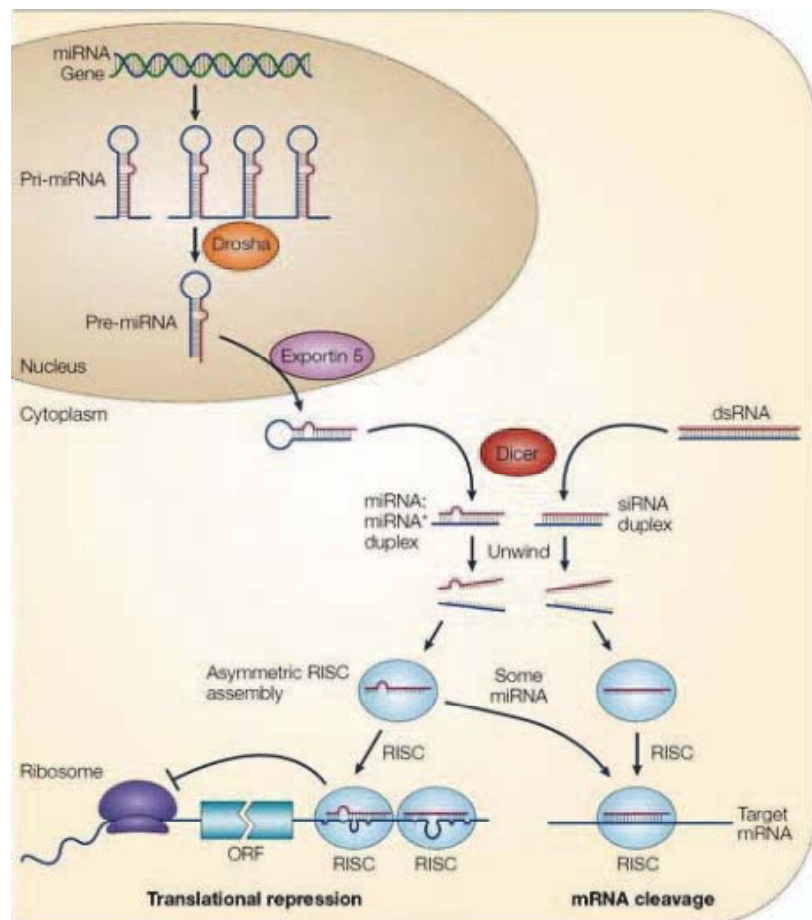


Figura 31. Via de la biogènesi dels miRNA en cèl·lules eucariotes.

Gràcies al seu descobriment i a la importància de la seva funció, s'han generat varies tècniques moleculars per utilitzar els microRNAs en la investigació. En aquest treball s'han utilitzat adenovirus que codifiquen per miRNAs, per així obtenir models cel·lulars *knock-down* dels gens d'interès.

1.3.5.1. Disseny i construcció d'adenovirus que codifiquen per miRNAs.

En aquesta Tesi s'ha utilitzat el mètode de generació d'adenovirus *Vira-power adenoviral expression system* (Invitrogen) que codifiquen miRNAs obtinguts mitjançant el kit de *Block-it miR RNA* (Invitrogen). Els miRNAs es dissenyen *on-line* a la pàgina de *Block-it miR RNA designer* (Invitrogen), on s'introdueix la seqüència del cDNA d'interès i el programa genera 10 possibles miRNAs al llarg de tota la seqüència.

S'han utilitzat miRNAs contra el cDNA de MLC1 que ja havien estat generats en el grup per la Dra. Anna Duarri i s'han dissenyat i construït miRNAs contra el cDNA de GlialCAM.

Els oligonucleòtids arriben com a DNA de cadena simple, una seqüència *top* i una altra *bottom* per cada miRNA (aquí només s'ha exemplificat la seqüència *top*, ja que la *bottom* és la complementària):

Scramble (SCR): El miRNA SCR està dissenyat de manera aleatòria perquè no s'uneixi a cap DNA conegut i serveixi com a control.

5'- tgctg aaatgtactgcgcgctgagac gtttggccactgactgac gtctccacgcagtacattt cagg -3'
 5' miRNA *antisense* loop miRNA *sense* 3'

miRNAs de MLC1: s'han utilitzat dos miRNAs dissenyats contra la zona codificant del DNA de MLC1 de rata:

miRNA 756

5'- tgctg tgcacagcgcaaataatccat gtttggccactgactgac atggattatgcgctgtgca cagg -3'

miRNA 905

5'- tgctg ttcaggatcaatttgcattcca gtttggccactgactgac tggatgcattgatcctgaa cagg -3'

miRNAs de GlialCAM: s'han dissenyat quatre miRNAs contra la zona codificant del DNA de GlialCAM de rata:

miRNA 523

5'- tgctg taagaaagcaaagacaggatg gtttggccactgactgac catcctgtttgtttccta cagg -3'

miRNA 845

5'- tgctg atgtgaggcggtcatcattct gtttggccactgactgac agaatgatccgcctcaat cagg -3'

miRNA 908

5'- tgctg tatagagcgccattggattct gtttggccactgactgac agaatccaggcgctctata cagg -3'

miRNA 1392

5'- tgctg aagatcagcgcctccaccatt gtttggccactgactgac aatgggtggcgctgatctt cagg -3'

Els miRNAs es clonen via *Gateway* en el pENTR-GFP per generar un *Entry Clone* que després es recombina amb el vector destí pAdV-CMV/V5-DEST per produir els virus. Els pri-miRNA estan basats en la seqüència murina del miR-155 (Lagos-Quintana et al., 2002) amb les regions 5' i 3' pel clonatge direccional i un *loop* terminal, que ajuda a formar l'estructura. Aquest casset es clona en el vector que porta la EmGFP (*Emerald Green Fluorescent Protein*) per poder identificar en tot moment les cèl·lules que han incorporat el vector:



METODOLOGIA:

1. Es resuspenen els miRNAs amb aigua Milli-Q a una concentració final de 200 µM i es procedeix a l'anellament dels dos oligonucleòtids per tal d'obtenir el miRNA de doble cadena (ds miRNA) a 50 µM.

En un tub eppendorf de 1,5 ml es produeix la reacció d'anellament amb els següents reactius:

Oligonucleòtid <i>top</i> (200 µM)	5 µl
Oligonucleòtid <i>bottom</i> (200 µM)	5 µl
Tampó d'anellament 10X	2 µl
Aigua DNase/RNase-free	8 µl
Volum total	20 µl

2. S'incuba durant 4 min a 95°C. Es deixa a temperatura ambient 10 minuts, es barreja i es fa un *spin*. Es fan unes dilucions seriades per tal d'obtenir el miRNA a 10 nM. Per això, en primer lloc es dilueix 1:100 amb aigua DNase/RNase-free (obtenint una concentració de 500 nM) i seguidament, es dilueix 1:50 amb tampó d'anellament 1X.
3. Es digereix el pENTR-boicot (pDONR221 modificat on s'ha introduït la EmGFP i una diana *Bsa I* de restricció on es clona el ds miRNA) amb l'enzim *Bsa I* a 50°C 1 hora.
4. Es purifica el DNA digerit amb el kit de purificació (Roche).
5. Es quantifica el DNA purificat i es dilueix amb aigua DNase/RNase-free fins a una concentració de 5 ng/µl.

6. Es fa la reacció de lligació entre els ds miRNAs i el vector digerit amb la següent relació:

pENTR-boicot digerit i purificat (5 ng/ μ l)	2 μ l
ds miRNA (10 nM)	4 μ l
Tampó lligació 5X	4 μ l
Aigua DNase/RNase-free	9 μ l
T4 lligasa (1 U/ μ l)	1 μ l
Volum total	20 μ l

S'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient i es para la reacció en contacte amb gel.

7. Es transforma 2 μ l de la lligació als bacteris DH5 α per electroporació i es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar que contenen 50 μ g/ml de kanamicina.
8. S'extreu el DNA (*Entry Clone*) de les colònies i es comprova per digestió i seqüenciació.
9. Es procedeix a la recombinació de l'*Entry Clone* amb el vector destí pAdV-CMV/V5-DEST mitjançant l'enzim LR clonasa II.

Per tal d'obtenir més eines i poder dur a terme els experiments d'imatge amb *Calcein-AM*, s'han utilitzat els miRNAs SCR i 905 de MLC1 fusionats a la proteïna *cherry* que té fluorescència vermella.

1.4. OBTENCIÓ DE RNA MISSATGER I CONSTRUCCIÓ DE RNA MISSATGER TRANSCRIT *IN VITRO*.

1.4.1. Normes generals en la manipulació del RNA.

Per la correcta manipulació del RNA és necessari recórrer a tractaments especials, ja que es tracta d'una molècula fàcilment degradable. Tant la manipulació com les solucions que s'utilitzen han d'estar lliures de la presència de RNases. Per això, és convenient seguir certes mesures de precaució:

- 1) La manipulació ha d'efectuar-se amb guants, ja que les mans són una font molt important de RNases.
- 2) El material de vidre ha d'estar tractat a 200°C durant un temps mínim de 4 hores.
- 3) El material de plàstic utilitzat ha d'autoclavar-se durant 20 minuts a 1 atmosfera de pressió i ha de ser manipulat sempre amb guants.
- 4) Els *stocks* dels reactius utilitzats han de ser lliures de RNases.
- 5) Els reactius s'han de pesar directament sobre recipients lliures de RNases. En cas que el reactiu sigui susceptible a l'autoclavat, ha de ser diluït en aigua Milli-Q i

posteriorment autoclavat on les RNAses són eliminades. En cas que la mostra no es pugui autoclavar, s'ha de tractar amb aigua DEPC.

6) Les electroforesis s'han d'efectuar en cubetes prèviament tractades amb etanol i reservades exclusivament per experiments amb RNA.

1.4.2. Obtenció de RNA missatger a partir de cèl·lules en cultiu.

L'extracció del RNA missatger es fa mitjançant el *kit Total RNA and protein purification from cultured cells and tissue* (Macherey-Nagel) segons el protocol del fabricant. S'ha procedit a l'extracció de RNA a partir de cultius primaris d'astròcits control o infectats amb Adenovirus miRNA SCR, miRNA GlialCAM 908 i miRNA GlialCAM 1392, crescuts en monocapa. Així, s'obtenen entre 2-3 µg de RNA que s'utilitza per dur a terme experiments de RT-PCR. Excepte la preparació del cultiu i els primers passos del protocol d'homogeneïtzació de la mostra i lisi cel·lular, el procés d'obtenció del RNA missatger i els experiments de RT-PCR s'han fet en col·laboració amb el Dr. Miguel López de Heredia (IDIBELL).

1.4.3. Construcció de RNA missatger transcrit *in vitro*.

Per poder realitzar estudis amb oòcits de *Xenopus*, s'ha hagut de preparar RNA missatger a partir del DNA dels gens d'interès. Per això s'han construït els diferents gens d'interès en vectors d'expressió adequats per poder generar el cRNA. El vector utilitzat majoritàriament ha sigut el vector d'expressió pCSDEST, que pot ser linealitzat amb un enzim de restricció deixant lliure el promotor SP6 a 5' del gen que s'ha clonat. Llavors, utilitzant la polimerasa SP6 i l'equip de transcripció *mMESSAGE mMACHINE* (Ambion), es pot generar aquest RNA missatger que serà injectat als oòcits de *Xenopus* per expressar les proteïnes d'interès. En el cas d'altres vectors d'expressió com el pTLN també s'utilitza el mateix equip de transcripció. En alguns casos però, com per exemple el vector d'expressió pT7TS s'ha d'utilitzar la polimerasa T7 i l'equip de transcripció corresponent (Ambion).

MATERIALS I REACTIUS

- Reactius de transcripció i polimerasa SP6 (o T7) del *kit mMESSAGE mMACHINE* (Ambion).
- Aigua DEPC.
- Etanol al 70% i al 95% en aigua DEPC.

METODOLOGIA

1. Digerir 10 µg de les construccions generades amb el vector pCSDEST amb l'enzim de restricció Not I per linealitzar-les.

2. Córrer les construccions linealitzades en un gel d'agarosa mitjançant una electroforesis i posteriorment purificar-les.
3. Transcripció *in vitro*: En un tub *ependorf* estèril lliure de RNAses es munta la reacció de transcripció amb els elements del *kit* i el DNA purificat, seguint el següent ordre:

2xNTP/CAP	5 µl
DNA purificat	3 µl
Tampó 10X	1 µl
<i>Enzime Mix</i> (SP6 polimerasa)	1 µl

La reacció s'incuba 2 hores a 37°C.

4. S'afegeixen 0,5 µl de Turbo DNAsa i s'incuba durant 15 minuts a 37°C.
5. S'afegeixen 40 µl d'aigua DEPC i 30 µl de la solució de precipitació de LiCl i s'incuba durant tota la nit (12-16 hores) a -80°C. A partir d'aquest punt les mostres de RNA sempre hauran d'estar en gel.
6. Es descongelen les mostres en gel i es centrifuguen a 13000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
7. S'elimina el sobrenedant amb molt de compte de no emportar-se el *pellet* de RNA (es sol utilitzar una agulla d'insulina per aspirar el sobrenedant).
8. Es renta el *pellet* amb 1 ml d'etanol al 70% en aigua DEPC i es centrifuga 20 minuts a 13000 rpm a 4°C.
9. Es descarta el sobrenedant i s'asseca el *pellet*, mantenint l'*ependorf* obert a temperatura ambient durant 10-15 minuts.
10. S'afegeixen 12 µl d'aigua DEPC i es resuspèn el *pellet* amb la pipeta.
11. Finalment s'utilitza 0,5-1 µl de la mostra per quantificar el RNA i 0,5-1 µl per córrer un gel d'agarosa per verificar la integritat del RNA.

La quantificació de la mostra s'efectua mitjançant el *Nano-Drop*, com es descriu en l'apartat 1.2.4., tenint en compte que 1 unitat d'absorbància correspon a 40 µg/ml de RNA. S'utilitza aigua DEPC com a mostra "blanc" i per calibrar l'aparell.

La verificació de la integritat del RNA es du a terme mitjançant un gel d'agarosa al 1% on es corren exclusivament mostres de RNA. La qualitat és major quan més nítides i discretes s'observin les bandes en el gel. Un RNA degradat es visualitza com una taca continua al llarg de tot el carril (*smear*).

2. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES.

2.1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL.

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

MATERIALS I REACTIUS

- PBS 1X

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

METODOLOGIA

La solubilització de proteïnes pot fer-se en condicions desnaturalitzants, amb detergents iònics que trenquen tota unió covalent, com per exemple el SDS, o bé poden fer-se en condicions no desnaturalitzants, amb detergents no iònics que són capaços de mantenir diferents unions no covalents (Tritó X-100, Tween-20, digitonina, etc.). En aquesta Tesi, el detergent que s'ha utilitzat majoritàriament per l'obtenció de proteïnes ha sigut el Tritó X-100.

La **solubilització d'extractes cel·lulars** es fa en fred per evitar la desnaturalització de les proteïnes. Es pot fer directament a la placa de cultiu o en un *pellet* cel·lular.

Solubilització en placa de cultiu:

1. Es renten les cèl·lules 2 cops amb PBS 1X per eliminar l'excés del medi de cultiu i s'afegeix sobre les cèl·lules el tampó de lisi (a 4°C, en gel). El volum de tampó de lisi utilitzat varia en funció del número de cèl·lules que hi ha, el qual depèn de la superfície o del diàmetre de la placa de cultiu on han sigut cultivades. Així, les cèl·lules procedents d'una placa de 100 mm de diàmetre són lisades amb 0,8-1 ml de tampó de lisi. En canvi, cèl·lules cultivades en un pou d'una placa multipou de 6 pous són lisades amb 150-300 µl de tampó si són cèl·lules HeLa o HEK, perquè si són astròcits primaris, encara que estiguin cultivats en el mateix tipus de placa, s'utilitza un volum més petit, al voltant de 75-100 µl.
2. Es raspa les cèl·lules mitjançant un raspador. Es resuspenen bé amb l'ajut d'una pipeta i es transfereixen a un tub *ependorf*.
3. S'incuba la mostra durant 1 hora a 4°C en agitació orbital.
4. Es centrifuga el lisat a 13000 rpm durant 10-15 minuts a 4°C i es recull el sobrenedant, el qual correspon a la fracció de proteïna soluble.
5. Es valora la concentració de proteïna (apartat 2.1.2.).

Solubilització en *pellet* cel·lular:

1. Es retira el medi de cultiu de les cèl·lules de cada placa de cultiu i es renten amb 10 ml de PBS 1X. El volum de PBS 1X varia si es treballa en plaques multipou de 6 pous.

2. Amb un raspador estèril, es desenganxen les cèl·lules immerses en el PBS 1X i es passen a un tub de 15 ml.
3. Es centrifuga el tub a 2500 rpm durant 5 minuts a 4°C i s'aspira el sobrenedant per quedar-se amb un *pellet* de cèl·lules. Aquest *pellet* pot ser congelat i guardat a -20°C per ser processat en un altre moment o bé, pot lisar-se amb tampó de lisi per procedir amb la solubilització. El volum de tampó de lisi és proporcional a la mida del *pellet* obtingut (normalment es segueixen les relacions explicades anteriorment).
4. L'homogenat s'incuba durant 1 hora a 4°C en agitació orbital.
5. Es centrifuga el lisat a 13000 rpm durant 10-15 minuts a 4°C i es recull el sobrenedant.
6. Es valora la concentració de proteïna.

La **solubilització de teixit** es fa de manera similar. Les mostres tissulars es conserven a -80°C i s'han de processar utilitzant neu carbònica. Es talla un fragment del teixit amb un bisturí i es posa en tampó de lisi amb un volum aproximat de 3 vegades el del teixit (a 4°C). S'homogeneïtza mitjançant un homogenitzador, i es resuspèn bé utilitzant les diferents puntes de pipetes, aconseguint que quedi tot l'homogenat sense agregats i amb el mínim de bombolles possible. Un cop s'obté l'homogenat es procedeix a la solubilització seguint el protocol anterior.

2.1.2. Determinació de la concentració proteica.

Després de l'extracció o la purificació de proteïnes, és necessari conèixer la seva concentració, no només per avaluar el rendiment de l'extracció, sinó també per establir un correcte anàlisi dels experiments efectuats amb aquestes proteïnes. Els mètodes de valoració de la concentració de proteïnes durant aquest estudi han sigut dos: el mètode Bradford i el mètode de BCA.

1) Mètode de Bradford.

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

MATERIALS I REACTIUS

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

- Solució comercial *BioRad Protein Assay* (Coomassie blau brillant G-250, àcid fosfòric i metanol), diluïda 1/5 en aigua destil·lada filtrada.
- Solució de BSA (albúmina bovina) a 2 mg/ml en aigua Milli-Q.

METODOLOGIA

1. S'ha de tenir en compte el tipus de mostra que es va a tractar, ja que en el cas dels extractes obtinguts a partir de teixits, la concentració de proteïna que solen presentar és molt elevada i per tant, és convenient diluir la mostra. Les mostres que provenen de cèl·lules es solen processar directament.
2. Es prepara la quantitat necessària de reactiu Bradford (diluït 1/5 en aigua destil·lada), tenint en compte que es necessiten 200 µl per cada pou i que per cada punt, tant de la patró com de cada mostra, s'han de realitzar duplicats.
3. En els primers pous de la placa ELISA, es preparen els punts necessaris per fer la recta patró (2 rèpliques per punt). La recta patró s'ha efectuat amb 0, 0,5, 1, 2 i 5 mg de proteïna (BSA) en un volum final de 10 µl. En els següents pous, es preparen 2 rèpliques d'entre 1 i 5 µl de cada mostra en un volum final de 10 µl.
4. S'afegeixen 200 µl de reactiu Bradford diluït. Posteriorment, s'agita la placa i es mesura en un lector d'ELISA a una absorbància de 595 nm.

2) Mètode de BCA.

És convenient valorar les mostres solubilitzades amb detergent pel mètode de BCA. El mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) (*Protein Assay Reagent*, 23225) s'ha realitzat seguint les especificacions del fabricant (Pierce). Aquest mètode es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir el Cu^{+2} . Els ions Cu^+ produïts s'uneixen a dues molècules de BCA produint un canvi en l'estructura electrònica de la molècula, fet que provoca que absorbeixi llum a 562 nm formant un compost de color porpra. En les condicions de la reacció, l'absorció del compost és proporcional a la concentració de proteïna present. No són compatibles amb aquest mètode mostres que continguin més de 100 mM de EDTA, 1 mM DTT o 20% de NH_3SO_4 .

MATERIALS I REACTIUS

- Placa ELISA de 96 pous.
- Lector ELISA (Biotek)
- Solució comercial (Pierce): Reactiu A (BCA, en condicions alcalines) i Reactiu B (4% de sulfat de coure). La barreja s'efectua a una ràtio de 50 ml de reactiu A per cada ml de reactiu B.
- Solució *stock* d'albúmina bovina (BSA) a 2 mg/ml en tampó fosfat (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM) pH 7,4, conservada a temperatura ambient.

METODOLOGIA

El mètode es realitza de manera similar al mètode de Bradford. Es fa la recta patró per duplicat (0, 0,5, 1, 2 i 5 mg) igual que les mostres (tot en un volum final de 10 µl). S'afegeixen 200 µl per pou del reactiu de BCA comercial (Pierce). En aquest cas, s'ha de deixar reaccionar el reactiu amb les mostres durant 20-30 min a 37°C. Finalment, es procedeix a la lectura mitjançant el lector d'ELISA a 595 nm.

2.2. OBTENCIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT.

En aquesta Tesi s'ha estudiat la possible interacció en *Trans* de GlialCAM. Per poder realitzar els assajos pertinents, s'ha construït i produït una proteïna recombinant que conté el domini extracel·lular de GlialCAM fusionat a la fracció constant (Fc) de la immunoglobulina G de ratolí o humana. Per això s'ha fusionat mitjançant el mètode de clonació clàssica el domini extracel·lular de GlialCAM al vector d'expressió *pINFUSE* (InvivoGen). Aquest vector de clonatge expressa els dominis CH2 i CH3 de la regió Fc (cadena pesada) de la IgG2 de ratolí (o humana), juntament amb una regió acobladora (*hinge region*) que provoca una unió flexible entre les dues parts de la proteïna de fusió, permetent que puguin funcionar independentment. A més a més, també presenta petits introns entre cadascuna de les tres parts (regió acobladora, domini CH2 i domini CH3) que milloren els nivells d'expressió gènica.

L'avantatge d'haver generat aquestes proteïnes recombinants és que actuen com un anticòs generat en ratolí o humà, i per tant, es poden utilitzar totes les eines generades per treballar amb anticossos per estudiar aquestes proteïnes de fusió.

2.2.1. Obtenció de proteïna recombinant a partir d'un cultiu cel·lular.

Es generen les construccions i es prepara un DNA concentrat i purificat mitjançant maxipreparacions. Es transfecten 20 µg de plàsmid en una placa de 10 mm de diàmetre de cèl·lules HEK que presenten alts nivells de transfecció. En el cas que la transfecció es realitzi pel mètode de fosfat de calci (apartat 3.3.1.), a les 24 hores de transfecció, es fan 3 rentats amb PBS1X i es canvia el medi per medi Opti-MEM amb Glutamax (Gibco) amb penicil·lina/streptomicina i glutamina. En el cas de realitzar la transfecció utilitzant transfectina (apartat 3.3.2.), en finalitzar el procés es canvia el medi per medi Opti-MEM amb Glutamax (Gibco) amb penicil·lina/streptomicina i glutamina.

Un cop s'ha transfectat el plàsmid, les cèl·lules es deixen incubant 3-5 dies a l'incubador a 37°C. Cada dia s'agafa el medi de la placa i es canvia per medi fresc, així

s'obté un sobrenedant ric en proteïna recombinant ja que aquesta és excretada al medi.

2.2.2. Concentració i purificació de proteïnes recombinants. Cromatografia d'afinitat per IgG lligada a sefarosa.

Un cop produïda, la proteïna recombinant fusionada a la Fc s'ha de concentrar i purificar (Boucard et al., 2005; Zhang et al., 2010). Per concentrar la mostra, s'han utilitzat els filtres en columna *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices* (Millipore). Aquestes columnes concentren mostres biològiques com ara antigens, anticossos, enzims, àcids nucleics, microorganismes, etc., mitjançant un sistema de filtració. Per la purificació s'ha utilitzat una columna d'afinitat de *Protein A Sepharose* (GE Healthcare) ja que té afinitat per les IgG i detectarà les proteïnes de fusió que continguin la Fc. Per la utilització dels *kits* s'han seguit les indicacions del fabricant.

MATERIALS I REACTIUS

- Sobrenedant de producció de proteïna recombinant.
- Solució d'ajust del medi (10 mM Hepes-NaOH pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mg/l pepstatina; 1 mg/l leupeptina i 2 mg/l aprotinina).
- Columnes *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices* (Millipore).
- *Protein A Sepharose* (GE Healthcare).
- Columnes *Polypropylene Econo-Column* (BioRad).
- Solució de rentat (TRIS 10 mM, pH 8).
- Solució d'equilibri i rentat (TRIS 100 mM, pH 8).
- Solució de neutralització (TRIS 1 M, pH 9).
- Solució d'elució (Glicina 100 mM, pH 2,7).
- Aigua destil·lada.
- Azida sòdica.

METODOLOGIA

1. Es centrifuga els sobrenedants a 1500 g durant 5 minuts per separar fragments cel·lulars que s'hagin pogut agafar amb el medi.
2. S'ajusta el sobrenedant resultant amb 10 mM Hepes-NaOH pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/l pepstatina, 1 mg/l leupeptina i 2 mg/l aprotinina.
3. Concentració de la mostra: Es posen 10 ml (15 ml com a màxim) del sobrenedant a les columnes *Amicon Ultra-15* i es centrifuga a 2700 g (4000 g com a màxim) durant 30 minuts (60 minuts com a màxim) a 4°C. Amb una pipeta es recupera el volum que queda a sobre el filtre (200-300 µl). En aquest punt es pot valorar la concentració de proteïna i guardar-la a -20°C o es pot continuar amb la purificació.

4. Preparació de la *Protein A Sepharose*: Es pesen 0,5 g de proteïna A sefarosa i s'afegeixen 7,5 ml d'aigua destil·lada en un tub de 15 ml. Es barreja bé i es centrifuga durant 1 minut a 1000 rpm. S'aspira el sobrenedant i es torna a afegir fins a 7,5 ml d'aigua destil·lada. Es torna a barrejar i es centrifuga en les mateixes condicions. Es repeteix el procés anterior unes 5 vegades. Després de l'últim rentat s'afegeix aigua amb 0,02% d'azida sòdica fins a 7,5 ml. Es guarda a 4°C en posició vertical.
5. Purificació de la mostra: S'agafa un volum determinat de proteïna A sefarosa i es col·loca a les columnes de BioRad. Habitualment, el volum que ocupa la reïna de proteïna A sefarosa és aproximadament igual al volum de mostra que es vol purificar.
6. S'espera a que la reïna es formi dins la columna i es fa un primer rentat omplint la columna amb aigua destil·lada, per netejar la reïna.
7. S'equilibra la columna amb un volum de TRIS 100 mM pH 8 i es deixa caure per gravetat.
8. Es guarda una petita part de la mostra abans de purificar per saber si ha anat bé la purificació. La resta de mostra es posa a la columna, es barreja tot (desfent la reïna) i s'incuba en agitació orbital a 4°C durant 12-16 hores.
9. Per gravetat es deixa caure el líquid incubat (*flow-through*) i al mateix temps la reïna es reconstitueix a la columna.
10. Es renta la columna amb un volum de TRIS 100 mM pH 8 i es deixa caure per gravetat.
11. Es fa un segon rentat de la columna amb un volum de TRIS 10 mM pH 8 i es deixa caure per gravetat.
12. Es preparen els tubs *ependorf* que serviran per recollir les fraccions d'elució. Per això, es posa a cada tub 10 µl de solució de neutralització (TRIS 1 M pH 9), ja que les fraccions d'elució seran de 100 µl (es necessita entre 60 i 200 µl de solució de neutralització per cada 1 ml de fracció).
13. S'elueix la columna amb glicina 100 mM pH 2,7. Per això, es posa 100 µl de solució d'elució a la columna i es recullen en el tub *ependorf* corresponent a la primera fracció. El procés es repeteix fins a tenir més de 20 fraccions d'elució.
14. Es valora la concentració de proteïna de les fraccions obtingudes per saber en quines fraccions s'ha eluït la proteïna produïda i purificada i es guarden a -20°C.
15. La columna es regenera passant un volum de glicina 100 mM pH 2,7 i deixant caure per gravetat.
16. Es realitza 1 rentat amb un volum de TRIS 100 mM pH 8 i es deixa caure per gravetat.

17. La columna es guarda a 4°C en posició vertical amb un volum de TRIS 100 mM pH 8 amb 0,05% azida sòdica.

2.3. ASSAIG DE WESTERN-BLOT (WB).

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

1. Electroforesi SDS-PAGE.

2. Transferència.

3. Immunodetecció.

2.3.1. Electroforesi SDS-PAGE.

L'electroforesi en gels desnaturalitzants d'acrilamida amb SDS és un sistema clàssic de separació de proteïnes en funció del seu pes molecular. El mètode es basa en que les proteïnes contingudes en una solució de SDS (detergent aniónic) són capaces de migrar sota un camp elèctric. L'SDS contingut en el tampó de càrrega de les mostres confereix a les proteïnes una càrrega negativa, mantenint la relació càrrega/massa constant. Si es sotmet aquestes preparacions a un camp elèctric establert sobre una malla de polímer d'acrilamida/bisacrilamida, les proteïnes migraran des d'un pol negatiu cap a un pol positiu en funció del seu pes molecular. En aquest tipus d'electroforesi, es preparen dos tipus de gels: un gel concentrador, la funció del qual consisteix en alinear les proteïnes abans de dur a terme la separació d'aquestes, i un gel separador, que com el seu nom indica, separa les proteïnes segons els seu pes molecular. La concentració d'acrilamida del gel separador dependrà de la mida de la proteïna que es vol migrar. Així, la separació de proteïnes amb un pes molecular menor serà més eficient en gels més concentrats i viceversa. Juntament amb la mostra problema, es fan migrar estàndards de pes molecular conegut i pretenyits com a marcadors per conèixer la mida de la proteïna problema.

MATERIALS I REACTIUS

- Extractes de proteïna total a partir de cèl·lules o teixit en un tampó de càrrega.
- Sistema de Western-Blot *Mini-Protean* (BioRad).
- Font de corrent elèctrica.
- Pipeta *Hamilton* de 50 µl.
- Tampó d'electroforesi 10X (Tris base 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1%). S'usa a 1X.

- Tampó de càrrega de les mostres LSB 4X (Per 40 ml: 8 ml Tris-HCl 2 M, pH 6,8; 32 ml glicerol; 3,2 g SDS; 160 µl de blau de bromofenol). S'usa a 1X.
- Solució gel separador (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS).
- Solució gel concentrador (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS).
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37,5:1) (BioRad).
- APS (Persulfat d'amoni 10% en aigua).
- TEMED .
- Blau de Coomassie (Àcid acètic 7,5% (v/v); isopropanol 25% (v/v); Blau brillant R (Sigma) 0,05% (v/v).
- Solució destenyidora (Àcid acètic 7,5% (v/v); isopropanol 7,5% (v/v)).
- DTT o β-mercaptoetanol.
- Estàndards de pes molecular pretenyits (BioRad o Fermentas).

METODOLOGIA

1. Preparació de les mostres. La barreja es realitza sempre en contacte amb gel (4°C). En un tub *ependorf* es prepara la quantitat de proteïna desitjada (entre 1 i 100 µg per mostra), a la que s'afegeix el tampó de càrrega LSB perquè quedi a una concentració final de 1X. Quan les mostres es preparen en condicions reductores, s'afegeix DTT a una concentració final de 100 mM o 5% de β-mercaptoetanol. Les mostres s'escalfen en un termoagitador i la temperatura dependrà del tipus de proteïna a immunodetectar. Per proteïnes de membrana, les mostres es processen a 60°C durant 2-5 minuts per evitar que es formin agregats. En canvi, per proteïnes citosòliques, les mostres es processen a 95°C durant 5 minuts. Es fa un *spin* a les mostres i ja es poden carregar en el sistema d'electroforesi.
2. Polimerització del gel. Prèviament al muntatge del sistema d'electroforesi, es renta amb etanol totes les peces que estan en contacte amb les proteïnes. El sistema es munta segons les indicacions del fabricant (BioRad). L'APS i el TEMED són els últims reactius que s'afegeixen a la solució dels gels. En la següent taula es mostren les relacions dels diferents reactius pels diferents percentatges dels gels d'acrilamida.

SEPARADOR (2 gels 1,5 mm, 20 ml)	7,5%	10%	12%	15%	CONCENTRADOR (2 gels 1,5 mm, 20 ml)	4%
Acrilamida 40%	3,8 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml	Acrilamida 40%	1 ml
Sol. separació	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	Sol. concentració	2,5 ml
Aigua	11 ml	9,8 ml	8,8 ml	7,3 ml	Aigua	6,5 ml
APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	APS	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	TEMED	20 µl

La solució es barreja lleugerament per inversió i es diposita lentament entre els vidres del sistema, amb la precaució que no es formin bombolles. El gel separador ha d'ocupar les tres quarts parts inferiors del sistema. Abans de la polimerització, s'afegeix una capa d'isopropanol a la part superior del gel perquè el límit superior sigui recte. Un cop polimeritzat el gel separador, es decanta l'isopropanol, es renta amb aigua i es diposita el gel concentrador. Ràpidament es col·loca la pinta, abans que es produeixi la polimerització del gel concentrador. A continuació es munta el sistema de vidres amb els gels polimeritzats a la cubeta d'electroforesi, que s'omple de solució d'electroforesi 1X, de manera que hi hagi continuïtat elèctrica.

3. Migració del gel. S'extreu la pinta i es carreguen les mostres mitjançant una pipeta *Hamilton* de 50 µl. Es tanca el circuit amb la tapa de la cubeta i es connecta a una font d'alimentació a un voltatge constant de 100-140 V, fins que el marcador de pes molecular s'hagi separat suficientment per poder detectar la proteïna d'interès.
4. Tinció de Coomassie: La tinció de gels ens permet veure el patró de bandes corresponents a totes les proteïnes que han migrat en el gel. En aquest treball ens ha servit per observar si ha sigut efectiva la producció i purificació de proteïnes de fusió. Es submergeix el gel en la solució de Coomassie durant 1 hora, en agitació i s'observa el patró de bandes que apareixen. Es destenyeix rentant el gel en la solució destenyedora, fent canvis cada 20 minuts, en agitació i, si és necessari, es fa un rentat durant tota la nit.

2.3.2. Transferència.

Un cop finalitzada la separació electroforètica, les proteïnes són electrotransferides a una membrana porosa de fluorur de polivinilidè (PVDF) de manera que quedin immobilitzades, permetent la posterior immunodetecció.

MATERIALS I REACTIUS

- Cubeta de transferència, amb els cassets de transferència i esponges corresponents (Sistema de Western-Blot *MiniProtean* de BioRad).
- Paper *Whatmann* 3MM (dos rectangles per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador).
- Membrana *Immobilon-P* (Millipore) (un rectangle de membrana de transferència per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador).
- Tampó de transferència 10X (250 mM Tris base; 1,92 M glicina, pH 8,3) S'usa 1X + 20% metanol (v/v). El mateix tampó s'utilitza pel muntatge dels cassets.
- Aigua destil·lada.
- Metanol.

METODOLOGIA

1. Primer, es procedeix a hidratar la membrana de manera que sigui receptiva a immobilitzar proteïnes. Per això, es submergeix la membrana en una cubeta amb metanol absolut durant 5 minuts i a continuació, en una altra cubeta amb aigua destil·lada durant 5 minuts més. Finalment es deixa equilibrar amb tampó de transferència.
2. Els cassets de transferència, les esponges i els papers *Whatmann* es submergeixen en tampó de transferència durant uns minuts. Es col·loca el casset obert amb la cara fosca al fons. A continuació, sobre la cara fosca es col·loca per aquest ordre, una de les esponges, un paper *Whatmann* i el gel separador (al que se li ha tret el gel concentrador prèviament). Posteriorment es col·loca la membrana de manera que no es formin bombolles entre el gel i la membrana, ja que impedeixen la transferència proteica. Sobre la membrana es col·loca l'altre paper *Whatmann* i una altra esponja i es procedeix a tancar el *sandwich*. Aquesta disposició permet un flux del tampó seguint el camp elèctric, des del gel cap a la membrana, transferint-hi les proteïnes immobilitzades en el gel.
3. Es col·loca el casset en la cubeta de transferència, prèviament omplerta amb tampó de transferència, de manera que el costat fosc coincideixi amb el pol negatiu dels elèctrodes ja que les proteïnes es transferiran en aquella direcció. També s'hi diposita una placa de gel per evitar el sobreescalfament del sistema. El temps de transferència depèn de la mida de la proteïna; així, quant més gran és el pes molecular de la proteïna, més temps de transferència s'ha d'aplicar. Generalment s'ha transferit a 250 mA durant 100 minuts o més, o tota la nit a 35 V a 4°C.

2.3.3. Immunodetecció.

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

MATERIALS I REACTIUS

- Solució de *Ponceau* (Àcid acètic 5% en aigua (v/v); *ponceau* 0,1%).
- Solució de bloqueig (5% de llet desnatada en pols en TTBS 1X, o 5% BSA en TTBS 1X).
- Anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig.
- Anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP) (diluïts 1/10000 en solució de bloqueig).

- Solució de rentat TTBS 1X (TBS 1X; 0,1% Tritó X-100).
- Reactiu ECL pel revelat (veure annex de solucions).
- *Hyperfilms* (Amersham) i casset de revelat.

METODOLOGIA

1. Les membranes de la transferència són dipositades en una cubeta amb solució de *ponceau* que tenyirà les proteïnes. Així es pot comprovar que la transferència ha funcionat bé i s'observa si han quedat bombolles. La membrana es destenyeix amb la mateixa solució de transferència.
2. Bloqueig de la membrana. És necessari bloquejar la membrana per evitar interaccions inespecífiques dels anticossos a les proteïnes electrotransferides. Per això, es preincuba la membrana amb una solució rica en proteïnes (llet, en aquest cas), que s'uniran als llocs d'interacció inespecífica. S'incuba la membrana en solució de bloqueig durant 60 minuts en agitació suau a temperatura ambient.
3. Incubació amb anticòs primari. L'anticòs primari s'ha de diluir en solució de bloqueig per tal d'establir certa competència entre les proteïnes de la llet (unions inespecífiques) i l'anticòs (unions específiques), de manera que l'anticòs no tingui cap altra possibilitat que la d'unir-se a la proteïna a la que està dirigit. La incubació es realitza en una bossa de plàstic *Glad* segellada que conté la membrana bloquejada i la solució d'incubació amb l'anticòs primari (1-3 ml) i es manté en agitació orbital suau durant 60 minuts a temperatura ambient o durant 16 hores a 4°C.
4. Rentat. Per tal de retirar l'excés d'anticòs primari de la superfície de la membrana, s'efectuen tres rentats de 10 minuts amb la solució de rentat en agitació suau, a temperatura ambient.
5. Incubació amb anticòs secundari. Per detectar les unions específiques de l'anticòs primari amb la proteïna d'estudi, la membrana s'incuba amb anticossos espècie-específics per a immunoglobulines G (IgGs), conjugats a l'enzim peroxidasa. Això permet detectar la interacció mitjançant una reacció hidrolítica que genera llum. L'anticòs secundari es dilueix també en solució de bloqueig (1:10000) i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient en agitació. Posteriorment, es tornen a efectuar tres rentats de 10 minuts en agitació amb la solució de rentat.
6. Revelat. El revelat es fa incubant la membrana amb una solució que conté luminol, compost que en ser hidrolitzat per la peroxidasa genera llum. Aquesta llum es detecta mitjançant l'exposició de la membrana sobre un *film* fotogràfic. S'incuba la membrana amb la solució de ECL durant 1 minut i es retira l'excés. El revelat es fa en una cambra fosca amb l'ajuda d'un casset de revelat, efectuant exposicions a

diferents temps sobre el paper fotogràfic *hyperfilm* d'alta sensibilitat. Els *films* es revelen amb un sistema de revelat fotogràfic.

7. En els casos que es requereixi una quantificació de les bandes obtingudes, s'escaneja el paper fotogràfic i s'utilitza el *software* informàtic *MultiGauge* (Fujifilm) per obtenir els valors d'intensitat de les bandes.

2.4. IMMUNOCITOQUÍMICA.

Durant aquesta Tesi s'han realitzat estudis immunocitoquímics en cèl·lules HeLa i en cultius primaris d'astròcits. S'ha estudiat la localització de les proteïnes candidates de l'interactoma de MLC1, el comportament de les proteïnes quimèriques de GlialCAM per si soles i la influència d'aquestes sobre MLC1 o CIC-2 i també s'ha caracteritzat la localització de MLC1, CIC-2 i GlialCAM endògens, així com proteïnes marcadores d'unions en astròcits en el model *knock-down* de GlialCAM i les corresponents complementacions del model.

MATERIALS I REACTIUS

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

METODOLOGIA

1. S'aspira el medi de cultiu i es realitzen 2 rentats amb PBS.
2. Es fixen les cèl·lules amb paraformaldehid 4% en PBS 20 minuts a temperatura ambient.
3. Es renten les cèl·lules per eliminar l'excés de paraformaldehid 3 cops amb PBS. Si no es realitza la immunocitoquímica en el moment, es poden guardar els cobreobjectes fixats a 4°C en PBS 1X però amb 0,05% d'azida sòdica, per evitar contaminacions.

4. Es dipositen els cobreobjectes en una placa estèril de 24 pous amb la cara on es troben les cèl·lules cap amunt i s'afegeix PBS. És molt important que els cobreobjectes no quedin secs.
5. Per tal d'eliminar l'autofluorescència de les cèl·lules, s'incuben en una solució de NH_4Cl 50 mM durant 10 minuts, i seguidament en una solució de glicina 20 mM, 10 minuts més.
6. A continuació, es permeabilitza la mostra amb la solució de permeabilització durant 10 minuts a temperatura ambient. (*)
7. S'efectua el bloqueig amb la solució de bloqueig durant 1-2 hores a temperatura ambient.

(*) Si la immunocitoquímica que es vol dur a terme no requereix permeabilització, les cèl·lules s'incuben directament en la solució de bloqueig (sense detergent). Tanmateix, si les cèl·lules han de permeabilitzar-se, es pot dur a terme la permeabilització i el bloqueig conjuntament amb la solució de bloqueig + permeabilització. En algunes ocasions, en funció de l'anticòs s'ha procedit a bloquejar amb BSA enlloc de FBS.

8. Es preparen els anticossos primaris a la dilució corresponent en la solució de bloqueig + permeabilització. És recomanable centrifugar l'anticòs per evitar l'agregació de les immunoglobulines. S'incuben els cobreobjectes amb la solució que conté l'anticòs primari dipositant 50 μl de la mateixa sobre un fragment de *parafilm* fixat sobre una superfície plana. Amb l'ajuda d'unes pinces de precisió, es col·loquen els cobreobjectes sobre les gotes, posant en contacte les cèl·lules amb la solució d'anticòs. La incubació es pot fer durant 1 hora a temperatura ambient o durant 12 hores a 4°C col·locant els cobreobjectes dins d'una cambra humida per evitar que la gota pugui evaporar-se.
9. Després de la incubació amb l'anticòs primari s'han d'efectuar rentats. Per això, es tornen a passar els cobreobjectes a la placa de 24 pous amb les cèl·lules cara amunt. Si la incubació amb l'anticòs primari ha sigut durant 12 hores a 4°C, els cobreobjectes s'han de temperar durant 15 minuts a temperatura ambient abans de procedir amb els rentats. S'efectuen 3 rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig + permeabilització, per eliminar l'excés d'anticòs primari.
10. Es prepara l'anticòs secundari marcat amb un fluorocrom en la solució de bloqueig + permeabilització a una dilució 1/500. A partir d'aquest moment, es mantenen les mostres sempre protegides de la llum. Es realitza una incubació de 2 hores a temperatura ambient.
11. Es realitzen 1 rentat amb solució de permeabilització i després 3 rentats amb PBS de 10 minuts cada un a temperatura ambient.

12. Es procedeix a muntar els cobreobjectes sobre un portaobjectes de vidre, on s'hi afegeix una gota del medi de muntatge *Vectashield*, generalment amb DAPI (1,5 µg/ml), el qual emet en la longitud d'ona de la llum ultraviolada. Les cèl·lules han de quedar en contacte amb el medi. El portaobjectes es deixa assecar durant 5 minuts tapat de la llum i s'asseca l'excés de medi. Finalment es fixa el cobreobjectes al portaobjectes. Els portaobjectes es guarden a la nevera a 4°C protegits de la llum.

2.4.1. Metodologia de *Cell Surface Binding Assay*.

La metodologia de *Cell Surface Binding Assay* permet identificar la interacció en *Trans* entre dues proteïnes de membrana (Boucard et al., 2005; Uemura et al., 2010). Aquesta metodologia es basa en una immunocitoquímica en cèl·lules, on s'utilitza com a anticòs primari una proteïna recombinant que conté la proteïna per la qual es vol testar la interacció, fusionada a la fracció constant d'alguna IgG (Fc). En utilitzar-se aquesta proteïna com a anticòs, primer ha de tenir lloc la interacció i posteriorment s'ha de realitzar la fixació de les cèl·lules i la detecció amb anticòsos secundaris. S'ha utilitzat aquesta tècnica per provar la possible interacció en *Trans* de GlialCAM.

MATERIALS I REACTIUS

- Cultiu cel·lular transfectat o infectat amb GlialCAM, plantat en cobreobjectes.
- Placa de cultiu de 24 pous.
- Pinces de cirurgia de precisió.
- Portaobjectes.
- PBS 1X estèril.
- Paraformaldehid 4% en PBS 1X.
- Solució d'incubació de proteïna recombinant (Fc) (DMEM complet sense FBS; 20 mM Hepes pH 7,4; 0,1% BSA).
- Solució de bloqueig (DMEM complet sense FBS; 20 mM Hepes pH 7,4; 4% BSA; 1% Goat serum).
- Anticòs primari (*anti GlialCAM monoclonal* (R&D Systems)).
- Anticòs secundari (*anti-mouse Alexa 488/568* (Molecular Probes)).
- Medi de muntatge *Vectashield* (Vector).
- DAPI.

METODOLOGIA

1. Es prepara la solució d'incubació de proteïna recombinant amb diferents concentracions de la proteïna que conté el domini extracel·lular de GlialCAM fusionat a la Fc de mouse (0,15 µM, 1,5 µM, 20 µg/ml, 40 µg/ml). Paral·lelament, també es prepara un anticòs primari contra la part extracel·lular de GlialCAM (ja

que la immunocitoquímica es realitza sense permeabilització), en la mateixa solució i en la concentració ideal de treball, que servirà com a control positiu del mètode.

2. S'incuben les cèl·lules que expressen GlialCAM, plantades sobre cobreobjectes en plaques de 24 pous, amb 250 µl/pou de la solució que conté cada concentració de proteïna Fc o cada concentració d'anticòs. S'incuba 12-16 hores a 4°C amb agitació suau.
3. Es realitzen 3 rentats amb PBS 1X estèril fred de manera ràpida.
4. Es fixen les cèl·lules amb paraformaldehid 4% en PBS 1X fred, 10 minuts i en contacte amb gel.
5. Es realitzen 3 rentats amb PBS 1X estèril fred de manera ràpida.
6. S'incuben les cèl·lules amb solució de bloqueig 1 hora a temperatura ambient amb agitació suau.
7. S'afegeix l'anticòs secundari marcat amb un fluorocrom a la solució de bloqueig que està en contacte amb les cèl·lules, a una concentració de 1/500. S'incuba les cèl·lules 45 minuts més, a temperatura ambient, agitació suau i protegides de la llum.
8. Es realitzen 3 rentats amb PBS 1X estèril de 10 minuts a temperatura ambient, agitació suau i protegint les mostres de la llum.
9. Es procedeix a muntar els cobreobjectes sobre un portaobjectes de vidre, on s'hi afegeix una gota del medi de muntatge *Vectashield*, generalment amb DAPI (1,5 µg/ml), el qual emet en la longitud d'ona de la llum ultraviolada. Les cèl·lules han de quedar en contacte amb el medi. El portaobjectes es deixa assecar durant 5 minuts tapat de la llum i s'asseca l'excés de medi. Finalment es fixa el cobreobjectes al portaobjectes. Els portaobjectes es guarden a la nevera a 4°C protegits de la llum.

2.4.2. Tractament de les dades obtingudes per immunocitoquímica.

Un cop realitzada la tècnica d'immunocitoquímica, s'ha utilitzat un microscopi confocal amb *spinning disk* DSU (Olympus) per adquirir imatges dels resultats obtinguts. Aquestes imatges han estat tractades posteriorment amb el programa informàtic *Image J*, amb el qual s'ha incorporat color i s'ha eliminat la senyal generada per l'autofluorescència de les pròpies cèl·lules.

En aquesta Tesi, s'ha fet l'estudi dels dominis de GlialCAM i la seva implicació en la funció de la proteïna mitjançant quimeres. Per determinar la localització en unions cel·lulars d'una proteïna concreta, s'ha dut a terme la tècnica d'immunocitoquímica i s'ha determinat si la proteïna es presentava concentrada en unions, realitzant el perfil

d'intensitat de fluorescència mitjançant el programa *Image J* i obtenint el valor R ($R = \text{Intensitat de fluorescència a la unió cel·lular} / (\text{Intensitat de fluorescència membrana cel·lula 1} + \text{Intensitat de fluorescència membrana cel·lula 2})$). Únicament quan R és igual o superior a 2 s'ha considerat que una proteïna està concentrada en unions, ja que una R al voltant de 1 significa que la intensitat de fluorescència que s'observa a la unió intracel·lular és la suma de la fluorescència provinent de la membrana de cada cèl·lula (**Figura 32**).

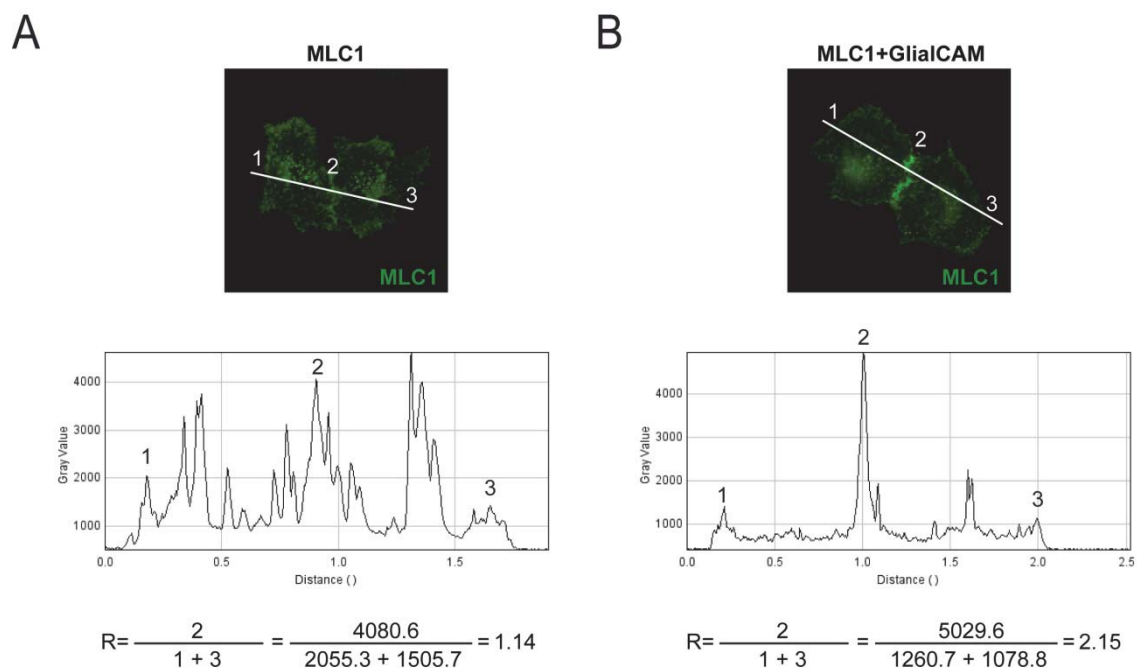


Figura 32. Càlcul del valor R per identificar localització en unions intracel·lulars. Cèl·lules HeLa transfectades amb MLC1 (**A**) o cotransfectades amb MLC1 i GlialCAM (**B**). Es mostra la imatge obtinguda per immunocitoquímica on s'ha afegit la línia que marca el perfil d'intensitat de fluorescència i els punts que es tenen en compte a l'hora de calcular el valor R. A sota es mostren els perfils d'intensitat de fluorescència obtinguts amb el programa *Image J*, on també hi ha marcats els punts de referència. Finalment es mostra el càlcul del valor R utilitzant els valors obtinguts. (Punt 1= intensitat de membrana de cèl·lula 1; punt 2= intensitat d'unió intracel·lular; punt 3=intensitat de membrana de cèl·lula 2).

2.5. MESURA DE L'EXPRESSIÓ EN SUPERFÍCIE PER CITOMETRIA DE FLUX.

Una estratègia que s'utilitza per detectar els nivells d'expressió a la membrana d'una proteïna és la immunodetecció d'aquesta a través de tècniques de citometria de flux.

En aquest treball, s'ha utilitzat aquesta tècnica com a possible forma de provar la interacció en *Trans* d'entre dues proteïnes (Romero et al., 2005; Sintès et al., 2007). Si s'expressa GlialCAM en cèl·lules i s'utilitza la proteïna quimèrica que conté el domini extracel·lular de GlialCAM fusionat a la Fc de ratolí com a anticòs primari de la immunodetecció, una detecció positiva de l'expressió en membrana de GlialCAM mitjançant citometria de flux indicaria que GlialCAM és capaç d'interaccionar en *Trans*.

MATERIALS I REACTIUS

- Cèl·lules HEK control o infectades amb un adenovirus que expressa GlialCAM.
- Tripsina.
- Solució de bloqueig (0,2% FBS en PBS 1X).
- Anticòs primari (*anti GlialCAM monoclonal* (R&D Systems)).
- Anticòs secundari (*anti-mouse Alexa 488* (Molecular Probes)).
- Citòmetre de flux.

METODOLOGIA

1. Es tripsinitzen (apartat 3.1.2.) les cèl·lules HEK control i les que expressen GlialCAM.
2. Es separa els homogenats en 6 grups i es centrifuguen durant 1 minut a 5100 rpm.
3. S'elimina els sobrenedants i cada *pellet* es resuspèn amb les següents solucions segons el grup experimental:

Control negatiu (100 µl de solució de bloqueig).

Control positiu (100 µl de solució de bloqueig amb una dilució 1/20 de l'anticòs primari anti GlialCAM).

Control d'anticòs secundari (100 µl de solució de bloqueig).

Condicció experimental 1 (100 µl de solució de bloqueig amb una dilució 1/2 de GlialCAM ext Fc mouse).

Condicció experimental 2 (100 µl de solució de bloqueig amb una dilució 1/10 de GlialCAM ext Fc mouse).

Condicció experimental 3 (100 µl de solució de bloqueig amb una dilució 1/50 de GlialCAM ext Fc mouse).

S'incuben les cèl·lules durant 30 minuts a 4°C (en gel), colpejant amb el dit cada 10 minuts per evitar que les cèl·lules precipitin.

4. Es centrifuguen les mostres a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C i es descarta el sobrenedant.
5. Es resuspenen el *pellets* en 1 ml de solució de bloqueig i es centrifuguen novament a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C.
6. Es resuspenen els *pellets* amb 100 µl de solució de bloqueig amb una dilució 1/20 d'anticòs secundari unit a un fluorocrom. El grup de control negatiu es resuspèn amb 100 µl de solució de bloqueig. Les mostres s'incuben durant 30 minuts a 4°C (en gel), colpejant amb el dit cada 10 minuts per evitar que les cèl·lules precipitin.
7. Es centrifuguen les mostres a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C i es descarta el sobrenedant.

8. Es resuspenen els *pellets* en 1 ml de solució de bloqueig i es centrifuguen novament a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C.
9. Es resuspenen les cèl·lules amb 1 ml de solució de bloqueig i ja poden ser analitzades per citometria de flux (FACS).

2.6. MESURA DE LA INTERACCIÓ MITJANÇANT ASSAJOS DE BIACORE (GE HEALTHCARE).

L'anàlisi de la interacció entre dues proteïnes mitjançant la tècnica de BIACORE (GE Healthcare), està basada en el fenomen de *surface plasmon resonance* (SPR) que aconseguix monitoritzar interaccions entre proteïnes en temps real (Kamisaka et al., 2011; Rahman et al., 2011). A part d'aquesta interacció, s'obté informació quantitativa, com ara el grau d'especificitat de la unió entre les dues proteïnes, quina concentració de proteïna és present i activa en la interacció, la cinètica d'associació i dissociació de les proteïnes o com de forta és aquesta unió.

El fenomen de SPR té lloc en una pel·lícula (*film*) que està col·locada al punt de contacte de dos medis amb diferents índex de refracció de la llum. En el cas del BIACORE, els medis són el vidre del xip sensor que s'utilitza i la solució on tenim la mostra, i el *film* és una petita capa de partícules d'or situada a la superfície del xip sensor. La llum és reflectida en unes determinades condicions (longitud d'ona de la llum incident i angle d'incidència) sobre el *film* i fa que s'excitin els electrons de les partícules d'or del *film*. Aquesta excitació provoca una absorció d'energia i el SPR és identificat com a una disminució de la intensitat de la llum reflectida (**Figura 33**).

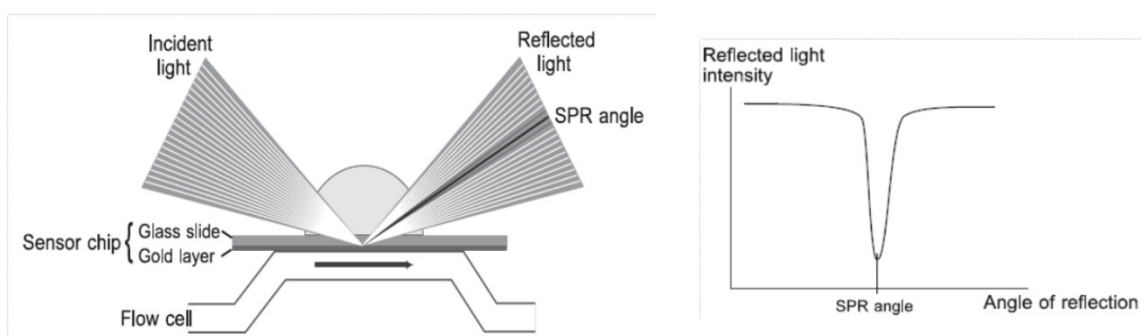


Figura 33. Esquema del fenomen SPR. Imatges extretes de *BIACORE Concentration Analysis-Handbook*.

En el BIACORE, la resposta SPR mesura l'índex de refracció que hi ha a la superfície del xip sensor. Aquest índex de refracció varia amb el contingut del solut. Quan una molècula s'uneix al xip sensor o quan es detecta una unió entre la molècula que està unida al xip i la molècula per la qual es testa la interacció, la concentració del solut a la superfície del xip sensor augmenta i això provoca canvis en la senyal SPR.

L'assaig de BIACORE, per tant, es basa en unir una de les dues proteïnes per les quals es vol testar interacció, en un xip sensor de forma directa o mitjançant una molècula captadora com per exemple el dextrà. Introduir aquest xip al BIACORE i passar per l'aparell una solució que contingui l'altra proteïna per la qual es vol testar interacció. Un cop es deixa de passar la proteïna per l'aparell s'observa si ha quedat unida a l'altra proteïna o no. Finalment es separen les proteïnes, mitjançant el procés de regeneració i recuperant el xip amb la primera proteïna unida, per continuar amb les condicions experimentals. Tots els canvis en la senyal SPR queden registrats en un sensograma (Figura 34).

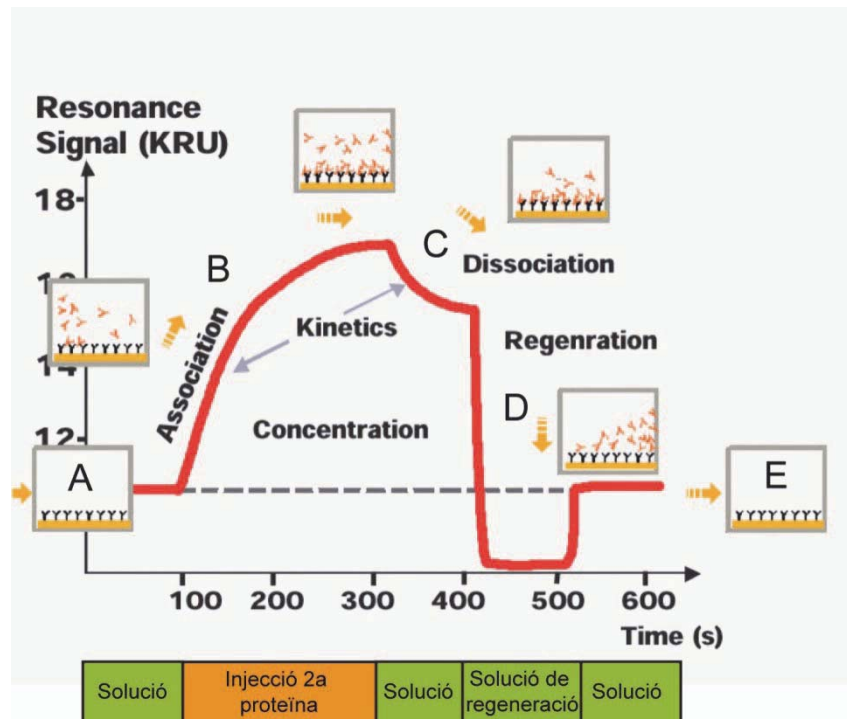


Figura 34. Sensograma obtingut en un assaig de BIACORE. Un cop hi ha hagut la immobilització de la primera proteïna en el xip sensor (amb o sense molècula adaptadora) (A), es procedeix a passar la segona proteïna implicada per sobre el xip i hi ha el període d'associació (B) on les dues proteïnes s'uneixen. En el període de dissociació (C), s'ha deixat de passar la segona proteïna i hi ha la dissociació de totes les molècules que no s'hagin unit. Aquesta dissociació ens mostra el nivell d'interacció entre les dues proteïnes, ja que si hi ha interacció, la dissociació és petita i si no hi ha interacció, la dissociació és molt gran i el sensograma arribaria als nivells basals. Finalment hi ha el període de regeneració, on es trenca la unió entre les dues proteïnes (D) per recuperar el xip sensor amb la primera proteïna unida (E).

Mitjançant aquest mètode, s'ha volgut identificar la possible interacció en *Trans* de GlialCAM. Per això, s'ha immobilitzat la proteïna quimèrica GlialCAM Ext Fc mouse a un xip comercial i s'ha utilitzat la mateixa proteïna com a proteïna en solució per detectar si hi ha interacció. També s'ha utilitzat una altra proteïna que conté Fc, com a proteïna control negatiu i un anticòs comercial contra la part extracel·lular de GlialCAM per bloquejar la possible interacció en *Trans* de les molècules de GlialCAM.

El procediment s'ha dut a terme als Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona.

MATERIALS I REACTIUS

- Proteïna produïda GlialCAM Ext Fc mouse.
- Proteïna produïda hv284 Fc mouse (Laboratori del Dr. Pablo Engel).
- Anticòs *anti GlialCAM monoclonal* (R&D Systems).
- Xip *CM5* (General Electrics).
- Aparell i software d'anàlisi *BIACORE T-100* (GE Healthcare).
- Solució d'activació (*1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride* (EDC); *N-hydroxysuccinimide* (NHS) relació 1:1 volum/volum).
- Solució de bloqueig (Etanolamina 1 M pH 8,5).
- Solució d'immobilització (Acetat de sodi 10 mM, pH 3,9).
- Solució de treball (medi HBSN 1X (NaCl 150 mM; Hepes 10 mM pH 7,4)).
- Solució de regeneració A (SDS 0,05%).
- Solució de regeneració B (Glicina 10 mM pH 2).

METODOLOGIA

Prèviament es comprova que les proteïnes d'estudi són capaces d'immobilitzar-se al xip comercial sense problemes.

1. Procés d'immobilització de proteïnes al xip i bloqueig dels canals control. S'han utilitzat 3 canals del xip, el canal 1 on no s'ha immobilitzat cap proteïna, el canal 2 on s'immobilitza la proteïna GlialCAM Ext Fc mouse, i el canal 3 on s'immobilitza la proteïna hv284 Fc mouse. En el canal 1, s'activa el xip injectant solució d'activació durant 420 segons a un flux de 15 µl/segon a 20°C i es bloqueja amb solució de bloqueig durant 420 segons a un flux de 15 µl/segon a 20°C. En els canals 2 i 3, s'activa el xip injectant solució d'activació durant 420 segons a un flux de 15 µl/segon a 20°C. S'injecta la solució d'immobilització amb una dilució de la proteïna GlialCAM Ext Fc mouse (1/100) o hv284 Fc mouse (1/50) durant 5 minuts a un flux de 5 µl/segon i finalment, es bloqueja injectant la solució de bloqueig durant 420 segons a un flux de 15 µl/segon.
2. Procés de passada de mostra. Es fa un banc de dilucions de diferents concentracions de la proteïna GlialCAM Ext Fc mouse en solució de treball. Les dilucions utilitzades han sigut 1/10, 1/100, 1/1000 i 1/10000. El procés es realitza a 20°C i es segueix un protocol de 1 minut d'injecció de mostra a 30 µl/segon, 1 minut de dissociació on s'injecta solució de treball sense mostra a 30 µl/segon i 30 segons de regeneració per mostra a cada canal. La regeneració s'efectua injectant solució de regeneració A durant 30 segons amb un flux de 30 µl/segon.

Per altra banda, s'ha volgut comprovar si els resultats obtinguts eren específics i s'ha utilitzat un anticòs monoclonal contra la part extracel·lular de GlialCAM com a bloquejador de la teòrica interacció. Per realitzar l'assaig d'especificitat s'ha seguit el

mateix procediment però realitzant un procés de “captura” de la proteïna unida al xip per part de l'anticòs.

3. Protocol d'especificitat per anticòs. Injecció de l'anticòs en una dilució 1/33 durant 2 minuts a un flux de 10 µl/segon, seguit de la injecció de les diferents concentracions de proteïna GlialCAM Ext Fc mouse durant 1 minut a 30 µl/segon. S'assigna un període de dissociació de 1 minut injectant solució de treball sense mostra a 30 µl/segon i finalment s'efectuen 2 períodes de regeneració, el primer amb solució de regeneració A durant 30 segons amb un flux de 30 µl/segon (per desunir GlialCAM Ext Fc mouse) i el segon amb solució de regeneració B durant 30 segons amb un flux de 30 µl/segon (per desunir l'anticòs).
4. Finalment s'analitzen les dades amb el *software* corresponent. Les dades obtingudes en el canal on hi ha GlialCAM unit es relativitzen amb les dades dels altres canals, per obtenir un sensograma sense la senyal d'interacció inespecífica amb xip (canal 1) ni la senyal d'interacció inespecífica amb una altra proteïna (canal 3).

2.7. MÈTODE DE COMPLEMENTACIÓ DE L'ACTIVITAT TEV PROTEASA (SPLIT-TEV).

El mètode de complementació de l'activitat TEV proteasa o Split-TEV és un mètode de complementació proteica que s'utilitza per detectar interaccions entre proteïnes. Un dels objectius i resultats d'aquesta Tesi ha sigut posar apunt aquest mètode en el laboratori i augmentar-ne l'especificitat per poder demostrar interaccions entre les diferents proteïnes en les quals el grup està interessat. Per tant, a continuació s'explica únicament la manera final d'implementar aquest mètode en el laboratori, ja que les especificacions tècniques (tipus d'enzims, tipus de substrats, tipus de construccions, etc.) s'expliquen en l'apartat corresponent de resultats i discussió.

El mètode Split-TEV es basa en que la proteasa TEV és dividida per la meitat i cada fragment és fusionat a les proteïnes candidates a interaccionar (**Figura 35**). Així, trobem una proteïna A (en blanc) que conté fusionat el fragment TEV-N, el lloc de reconeixement de la TEV proteasa i un factor de transcripció GV, sota el control d'un promotor d'alta expressió com el CMV. L'altra proteïna d'interès (B, en groc) està fusionada al fragment TEV-C i la seva expressió està controlada per un promotor de baixa expressió com el TK. Si hi ha interacció entre les dues proteïnes, es reconstitueix l'activitat TEV proteasa, la qual talla pel lloc de reconeixement i allibera el factor de transcripció GV que és capaç d'entrar al nucli i activar l'expressió d'algun gen reporter (que en el nostre cas és la *Gaussia luciferase* secretada) després d'unir-se a 5 elements de resposta Gal4 (5xUAS). La luciferasa és alliberada al medi de cultiu i la

seva activitat pot monitoritzar-se després de la reacció amb colenterazina en un luminòmetre.

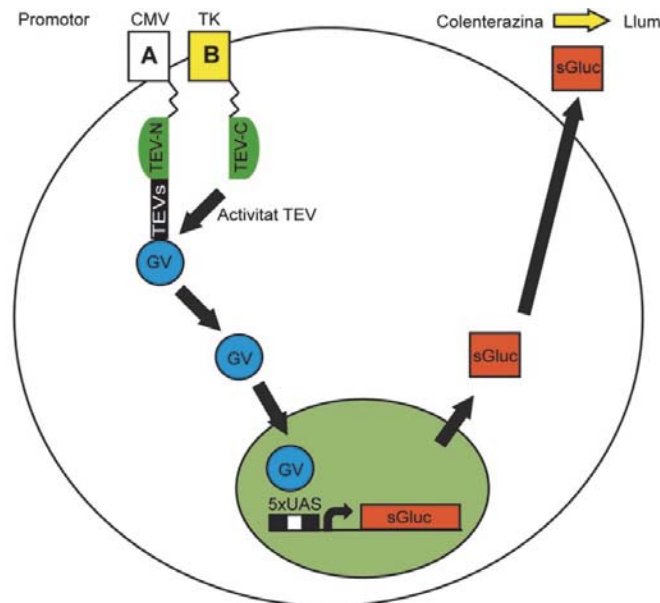


Figura 35. Esquema representatiu del mètode Split-TEV.

MATERIALS I REACTIUS

- Plaques de 6 pous.
- Medi DMEM (Biological Industries) complet (10% FBS; 1% Penicil·lina/Estreptomicina; 1% Glutamina).
- Medi de transfecció Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- PBS 1X estèril.
- Transfectina (BioRad).
- Cèl·lules HeLa.
- Colenterazina nativa (Nanolight Technology).
- Solució de solubilització (PBS 1X; 1% Tritó X-100; 1 mM PMSF; 1 mg/l pepstatina; 1 mg/l leupeptina i 2 mg/l aprotinina).
- Kit comercial *β-Galactosidase Detection Kit II* (Clontech).
- Luminòmetre TD-20/20 (Turner BioSystems).

METODOLOGIA

1. Es sembren al voltant de 275.000 cèl·lules HeLa en plaques de 6 pous i es deixen a l'incubador durant 12-16 hores a 37°C.
2. Si les cèl·lules es troben a una confluència del 60-70%, es transfecten les corresponents construccions mitjançant transfectina (apartat 3.3.2.). Es transfecta 2 µg de DNA total amb el següent *ratio* de construccions: 0,75 µg de cada plàsmid que codifica per les proteïnes que contenen els fragments TEV-N i TEV-C; 0,3 µg

del gen reporter pNEBr-X1Gluc; i 0,2 µg del vector pCMV-βGal, com a control de l'eficiència de transfecció.

3. Després de 48 hores, s'agafen 20 µl del sobrenedant de les cèl·lules i s'analitzen en el lluminòmetre després de l'adició de Colenterazina nativa a 20 µM (en PBS 1X estèril).
4. Per normalitzar les dades respecte l'eficiència de transfecció, es solubilitzen les cèl·lules de cada grup experimental, s'agafen 30 µl de cada lisat cel·lular i es posen en un tub *eppendorf*.
5. Paral·lelament, es prepara la barreja de reacció del *kit β-Galactosidase Detection Kit II* (Clontech), amb 196 µl de *Reaction Buffer* i 4 µl de *Reaction Substrate* per cada mostra.
6. Es munta la reacció de mesura de l'activitat β-Galactosidasa, barrejant els 30 µl de cada lisat cel·lular amb 200 µl de la barreja de reacció. S'incuba 1 hora a temperatura ambient.
7. Es registra l'emissió de llum en el lluminòmetre, mostra a mostra: des del primer tub fins l'últim i quan s'hagi processat l'última mostra, es detecta dues vegades seguides i es torna a registrar l'emissió de llum des de l'últim tub al primer. Això es fa perquè l'activitat β-Galactosidasa durant 1 hora després de la incubació no para, i d'aquesta manera es pot fer una mitja dels 2 valors obtinguts i tenir un valor més acurat.
8. Un cop obtingudes totes les dades, es divideix el valor de luminescència entre el valor d'activitat β-Galactosidasa de cada mostra per corregir les diferències en l'eficiència de transfecció. S'ha de tenir en compte que sempre s'ha de transfectar sola, la construcció que conté la proteïna fusionada al fragment TEV-N+lloc de reconeixement de la TEV+factor de transcripció GV, de manera que es pugui tenir una idea del soroll o *background* d'aquesta proteïna, ja que pot presentar autoproteòlisi del factor de transcripció GV i per tant, activitat basal. El valor de luminescència dividit per el valor d'activitat β-Galactosidasa obtingut per aquesta construcció és el que s'utilitza com a referència per calcular les vegades d'inducció de la senyal obtinguda en els grups experimentals respecte aquest grup que es considera la senyal basal (*fold* d'inducció).

3. CULTIUS CEL·LULARS.

La manipulació de cèl·lules en cultiu implica treballar en unes condicions de màxima esterilitat i higiene. Qualsevol petita contaminació, sigui d'origen fúngic o bacterià, comprometrà l'experiment que s'està duent a terme. S'ha de treballar sempre sota una campana de flux vertical. Abans de començar a treballar, s'han de rentar les mans amb sabó i seguidament amb etanol al 70%. El material fungible que s'utilitzi ha de ser estèril i s'ha d'obrir sota la campana. Els medis de cultiu i solucions que estaran en contacte amb les cèl·lules han de ser estèrils (autoclavats, filtrats, irradiats, etc.) i és convenient temperar-los a 37°C en un bany, així com ruixar-los amb etanol al 70% abans de ser utilitzats. També s'han d'obrir única i exclusivament sota la campana. Tant abans com després del seu ús, la campana s'ha de netejar amb etanol al 70% i encendre la llum U.V. durant 10 minuts.

3.1. LÍNIES CEL·LULARS.

En aquest treball s'han utilitzat principalment dues línies cel·lulars: cèl·lules HeLa i cèl·lules HEK293. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i per tenir incorporades seqüències del papilomavirus humà (HPV-18). La línia HEK deriva de cèl·lules epitelials de ronyó humà, i està transformada amb el gen E1A d'adenovirus (Graham et al., 1977). La línia 293T, concretament, consisteix en un derivat de la línia 293, que a més a més, expressa l'antigen T del virus SV40, que permet la replicació episomal de plàsmids que continguin un origen i una regió promotora primerenca de SV40 (Alwine, 1985).

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

Les condicions de cultiu per cèl·lules HeLa o HEK293 són a 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. El medi de cultiu per cèl·lules adherents és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biological Industries) sense suplementar que es guarda a la nevera a 4°C. La suplementació consisteix en afegir substàncies com glutamina, antibiòtics o sèrum fetal boví (FBS) que es mantenen a -20°C. Els antibiòtics utilitzats rutinàriament han sigut la penicil·lina que inhibeix la síntesi de peptidoglicans de la paret bacteriana, i l'estreptomicina que inhibeix la síntesi del ribosoma 70S bacterià. El FBS s'ha sotmès a un tractament previ d'inactivació del complement i anticossos a 56°C durant 25 minuts. Regularment es realitzen proves per comprovar l'absència de contaminació per micoplasma. El medi es canvia cada tres dies i es fa un seguiment del creixement del cultiu de manera que quan està proper a la màxima confluència es tripsinitza i es torna a sembrar el cultiu més diluït.

3.1.2. Tripsinització.

Tant les cèl·lules HeLa com les HEK293 creixen ràpidament, amb la conseqüència que quan la placa està confluent, és a dir, quan la monocapa de cèl·lules ocupa aproximadament el 100% de la placa, les cèl·lules s'han de desenganxar per evitar que comencin a morir. Això s'aconsegueix mitjançant el procés de tripsinització, seguit d'un recultiu de les cèl·lules a una densitat de 5 a 10 vegades menor. Per això, s'elimina el medi de cultiu que cobreix les cèl·lules i s'efectuen 2 rentats amb PBS 1X estèril. Els rentats són necessaris ja que els factors presents en l'FBS del medi inhibeixen l'acció de la tripsina. A continuació s'afegeix la tripsina (Tripsina-EDTA 1X (Biological Industries). El volum a afegir varia depenent de la mida de la placa de cultiu (per exemple, 200 µl per pou en plaques de 6 pous, 1 ml en plaques de 10 cm de diàmetre, 2 ml en flascons de 75 cm², etc.). La tripsina s'incuba durant 5 minuts a 37°C a l'incubador. La reacció es para quan s'observa al microscopi que les cèl·lules s'han desenganxat i disgregat de la placa, afegint medi de cultiu (que conté FBS, el qual inactivarà la tripsina). Les cèl·lules es resuspenen bé i es poden contar, així com sembrar o fer un cultiu de manteniment, que generalment es realitza a una dilució 1:10.

3.1.3. Congelació de cèl·lules.

Les cèl·lules eucariotes són capaces de suportar processos de congelació quan aquests es donen de forma gradual i amb la presència d'un agent crioprotector que evita la formació de cristalls d'aigua que puguin trencar la cèl·lula. Una vegada s'han tripsinitzat, les cèl·lules poden ser congelades. Es passen les cèl·lules a un tub i es centrifuguen 5 minuts a 1000 rpm. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* de cèl·lules amb DMEM complet que conté un 10% de DMSO (1 ml per cada 2×10^6 cèl·lules). Es fan alíquotes (d'aproximadament 1 ml) en criotubs i utilitzant un *cooler*, es proporciona una congelació gradual. El criotubs es dipositen al congelador de -80°C entre 10 i 16 hores i es dipositen en nitrogen líquid a -190°C.

3.1.4. Descongelació de cèl·lules.

La descongelació s'ha d'efectuar de manera ràpida (al contrari que el procés de congelació), amb l'objectiu d'eliminar ràpidament el DMSO del medi, el qual és tòxic per a les cèl·lules. Per això, s'incuben les cèl·lules del criotub a 37°C i un cop descongelades, es resuspèn el contingut en un tub *corning* amb 10 ml de medi de cultiu temperat a 37°C. Seguidament, es centrifuga 5 minuts a baixa velocitat (1000 rpm), s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules novament en 10 ml de

medi, els quals es plaquegen en una placa de cultiu i es deixen créixer a l'incubador a 37°C.

3.2. CULTIUS PRIMARIS.

El motiu pel qual s'ha procedit a treballar amb cultius primaris d'astròcits és que es volia treballar amb una línia cel·lular que expressés MLC1 de manera endògena. Anteriorment en el grup s'havien testat un ampli conjunt de línies cel·lulars amb la finalitat de trobar-ne alguna que expressés MLC1 de manera endògena, però el resultat va resultar negatiu. L'únic sistema cel·lular on MLC1 s'expressa endògenament és el cultiu primari d'astròcits. És per això que s'han realitzat cultius primaris d'astròcits ja que són un bon model per portar a terme estudis que serveixen per complementar part dels resultats obtinguts en cèl·lules transfectades i es poden generar models de la malaltia MLC, ja que els cultius primaris d'astròcits són un model cel·lular més pròxim a la realitat que les línies cel·lulars. Per a l'obtenció d'astròcits primaris purs, s'han utilitzat rates d'estadi post natal entre P0 i P3, i s'ha seguit el protocol de (McCarthy and De Vellis, 1980) i (Baorto et al., 1992). Així mateix, aquest protocol està aprovat pel comitè ètic de la Universitat de Barcelona i l'Estabulari de Bellvitge.

3.2.1. Obtenció de cultius primaris d'astròcits de rata.

MATERIALS I REACTIUS

- Rates de la soca Sprague-Dawley (Charles River), en estadi P0-P3.
- Material de cirurgia (tissors, pinces de microcirurgia i micropinces tallants).
- Plaques de Petri de 10 cm i de 35 mm de diàmetre.
- Pipetes Pasteur de plàstic estèrils.
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils.
- Cobreobjectes estèrils pre-tractats amb 100 µg/ml de poli-D-lisina.
- Tubs *corning* estèrils de 15 ml i de 50 ml.
- Filtre de 100 µm Falcon.
- Flascons de 25 ml.
- Cambra de Neubauer.
- Lupa binocular (Nikon).
- Medi de dissecció (PBS 1X; 0,3% BSA; 0,6% glucosa) estèril, a 4°C.
- Poli-D-Lisina a 100 µg/ml (Sigma).
- Medi de cultiu DMEM (Biological industries) complet (10% FBS; 1% Penicil·lina/Estreptomicina; 1% glutamina).
- Tripsina-EDTA 1X (Biological Industries).

- DNAsa I (1000 U/ml en 0,15 M NaCl).
- Ara C (Sigma) (4 mM).
- dBAMPc (Sigma) (250 mM).

Tractament de les plaques de cultiu i dels cobreobjectes:

Per assegurar la màxima adherència dels astròcits en els cobreobjectes de les plaques de 24 pous, es tracten les superfícies amb poli-D-Lisina. Així, es col·loquen els cobreobjectes estèrils a la placa i s'afegeix una solució de poli-D-lisina 100 µg/ml en aigua Milli-Q (200 µl aproximadament). S'incuben a 37°C d'1 hora a tota la nit. Posteriorment, es retira i es fan 3 rentats amb aigua Milli-Q estèril i es deixen assecar.

METODOLOGIA

Els cultius primaris d'astròcits han sigut obtinguts a partir del còrtex i l'hipocamp de rates en estadis P0-P3. El procés d'extracció del cervell i microdissecció s'efectua sempre en fred i en les condicions de major esterilitat possible.

1. Les cries són anestesiades en gel i posteriorment decapitades amb unes tisores. Es dipositen els caps sobre una placa de Petri. L'extracció del cervell es realitza amb l'ajut d'unes pinces de microcirurgia i unes tisores. Per això, es subjecta el cap clavant unes pinces als ulls, i amb unes tisores, es secciona l'epidermis per separar la pell del cap. Es talla l'os del crani per la línia mitja, procurant no danyar el cervell. S'obren els ossos i es treu el cervell per sota amb l'ajuda d'unes pinces, i es col·loca en una nova placa de Petri amb medi de dissecció fred.
2. La placa amb el cervell es col·loca sota una lupa i primerament es separa el cerebel del còrtex fent un tall amb les pinces i així mateix es separen els dos hemisferis per la línia mitja. També s'extreuen els bulbs olfactoris.
3. Els còrtexs es col·loquen en posició ventral i amb les pinces s'extreu el tàlem i les meninges. Un cop extret el tàlem, per la part de sota els hemisferis, es poden observar els hipocamps amb una forma semicircular de mitja lluna.
4. Amb l'ajuda d'unes micropinces de precisió tallants, es pot aïllar els hipocamps, accedint des de la regió ventral dels hemisferis. Tant els còrtex com els hipocamps es dipositen en medi de dissecció nou fresc en una placa de Petri.
5. També s'han realitzat cultius de còrtex juntament amb hipocamp. En aquest cas, es procedeix igual que abans, extraient el tàlem en cada hemisferi amb l'ajuda d'unes pinces i deixant l'hipocamp, es procedeix a retirar les meninges. Cada hemisferi presenta un aspecte còncav recobert únicament pel còrtex cerebral i l'hipocamp. Es dipositen també en medi nou fresc.
6. Seguidament es transfereixen els hipocamps o els còrtexs a una placa de Petri de 35 mm de diàmetre, que conté 2 ml de tripsina i DNAsa I (1/100) (prèviament preparada i equilibrada a l'incubador), i s'incuben a 37°C durant 10 minuts.

7. Es traspassen les mostres a un tub de 50 ml amb 5 ml de DMEM complet amb DNAsa I (1/100) i es procedeix a la disgregació mecànica utilitzant cada vegada una pipeta de porus més petit. Es deixa reposar 5 minuts i es transfereix el medi completament disgregat a un altre tub de 50 ml amb 5 ml de DMEM complet, i es torna a homogeneïtzar amb varies Pasteur de porus de diferents mides.
8. Es centrifuguen les mostres 5 minuts a 1000 rpm a temperatura ambient. Es retira el sobrenedant i es resuspèn generalment amb 10 ml de DMEM complet (el volum depèn de la mida del *pellet* de cèl·lules obtingut). L'homogenat obtingut es passa per un filtre de 100 µm per evitar agregats.
9. Es procedeix a la sembra de cèl·lules en flascons, amb la relació de 1 flascó per cada 3 cries de rata, afegint medi DMEM complet fins a 10 ml. S'incuben a 37°C.
10. Es canvia el medi el dia següent, i cada 2-3 dies.

3.2.2. Purificació del cultiu d'astròcits.

Un cop sembrat el cultiu, el qual està format per cèl·lules gials (astròcits, oligodendròcits i microglia) es deixa créixer entre 7-10 dies fins que arriba a la màxima confluència. Per eliminar els oligodendròcits i la microglia i aconseguir un cultiu pur d'astròcits, es procedeix a fer una agitació mecànica forta, ja que els astròcits són capaços d'enganxar-se molt bé a la superfície plàstica de la placa, mentre que la resta de cèl·lules no. Per aquest pas, es canvia el medi dels flascons unes hores abans de l'agitació i es deixen equilibrar a l'incubador per tal que agafin la concentració adequada de CO₂. En un incubador a 37°C s'ha d'instal·lar un agitador on s'han col·locat els flascons amb el tap ben tancat i segellats amb *parafilm*. Es procedeix a una agitació durant tota la nit a 250 rpm a 37°C. Després d'aquest procés, s'obté un cultiu primari d'astròcits de rata d'aproximadament un 95% de puresa. Es retira el sobrenedant, es fan 3 rentats amb PBS 1X estèril i es tripsinitzen els astròcits. Finalment es sembren les plaques de cultiu a una densitat de 50.000-85.000 cèl·lules en plaques de 24 pous, 200.000-300.000 en plaques de 6 pous i 10⁶ en plaques de 100 mm de diàmetre. El medi es canvia cada 3-4 dies.

3.2.3. Diferenciació del cultiu d'astròcits.

Durant aquesta tesi s'ha procedit a diferenciar els astròcits amb 2 compostos diferents: **Cytosine β-D-arabinofuranoside (Ara C)** i **dibutiril AMP cíclic (dBAMPc)**.

Tractament amb Ara C.

Quan el cultiu pur d'astròcits arriba a un 80% de confluència, es procedeix a realitzar el tractament amb Ara C 4 µM (dilució 1/1000 del *stock* preparat). És un compost que

inhibeix la síntesi de DNA, i que provoca que els astròcits es parin en la fase G_0/G_1 del seu cicle cel·lular. Es cultiven d'aquesta forma durant 3 setmanes, i es procedeix a fer els experiments. Aquesta parada de cicle amb Ara C es realitza perquè experiments previs en el grup van demostrar que es necessita aquest tractament per observar una localització de MLC1 a les unions astrocitàries (Duarri et al., 2011). Per això, aquest és el model en que normalment s'ha treballat.

Tractament amb dBAMPc.

Aquest tractament s'ha dut a terme quan s'han hagut de realitzar registres electrofisiològics d'astròcits de rata mitjançant la tècnica de *Patch-Clamp*. Aquests registres els ha realitzat el Dr. Xavier Gasull, professor titular de la Universitat de Barcelona. Per implementar aquesta tècnica, els astròcits han d'estar tractats amb dBAMPc perquè els astròcits que creixen en cultiu són cèl·lules epitelioides polygonals una mica aplanades, i per tant, és molt difícil poder-les registrar electrofisiològicament. Amb el tractament amb dBAMPc la seva morfologia canvia, transformant-se en cèl·lules més estrellades on el cos cel·lular no queda tant aplanat, podent ser registrades. Els astròcits amb dBAMPc es poden registrar de manera òptima a les 2 setmanes de tractament. Es cultiven en flascons o en plaques de cultiu i 3 dies abans de l'experiment de *Patch-Clamp*, els astròcits són tripsinitzats i plantats sobre cobreobjectes en plaques de 24 pous a una confluència al voltant de 10000 cèl·lules per pou.

3.3. TRANSFECCIÓ CEL·LULAR.

Durant aquesta tesi, s'ha procedit a la transfecció de DNA en els diferents tipus cel·lulars estudiats de diferents maneres. Així, en el cas de les línies cel·lulars de HeLa i HEK293 s'ha utilitzat la metodologia de la transfecció transitòria utilitzant el fosfat càlcic, així com el sistema de liposomes utilitzant els compostos lipofectamina 2000 (Invitrogen) o transfectina (BioRad). En el cas dels astròcits primaris, s'ha utilitzat un sistema lipídic amb el compost lipofectina (Invitrogen).

3.3.1. Transfecció transitòria amb fosfat de calci en cèl·lules HeLa i HEK293.

Aquest mètode es basa en la introducció d'un co-precipitat de fosfat de calci i DNA exogen a l'interior de la cèl·lula. El precipitat s'adhereix inicialment a la superfície de la cèl·lula i posteriorment és endocitat. Aquest precipitat es forma al barrejar dues solucions, una solució salina que conté clorur de calci i una altra que conté fosfat. El

DNA es queda incorporat en aquest precipitat amb el que serà endocitat. L'èxit d'una transfecció depèn de diversos factors:

- 1) El pH de la solució de fosfat: petites variacions del pH determinen la mida del precipitat i l'entrada a la cèl·lula. Per això, és recomanable provar l'eficiència de transfecció amb solucions de fosfat de diferents pH, dins d'un rang òptim teòric de 6,5 a 7,5. Aquest rang pot variar considerablement entre les diferents línies cel·lulars.
- 2) La quantitat del DNA que s'utilitza: en aquest cas s'han utilitzat 20 µg de DNA per una placa de 10 cm de diàmetre, 4 µg per un pou d'una placa de 6 pous, o 1 µg en un pou d'una placa de 24 pous. També és important tenir present la qualitat del DNA que s'utilitza. És convenient que la concentració del DNA sigui superior a 1 µg/µl, i que generalment s'hagi obtingut a partir de maxipreparacions.
- 3) La densitat del cultiu cel·lular en el moment de la transfecció: aquest paràmetre depèn de cada tipus cel·lular. Les cèl·lules HeLa o HEK293 normalment es transfecten bé a una confluència del 45-60%.

MATERIALS I REACTIUS

- Medi de cultiu DMEM complet (10% FBS inactivat; 1% penicil·lina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (a un 45-60% de confluència).
- Solució de clorur de calci (500 mM CaCl₂; 100 mM BES (Fluka)). S'ajusta a pH 6,95, es filtra amb un filtre de 22 µm sota la campana de cultius i es conserva a temperatura ambient.
- Solució de fosfat (50 mM NaCl; 750 µM Na₂HPO₄; 750 µM NaH₂PO₄; 50 mM BES). Es prepara diferents solucions amb diferències de pH de 0,05 en un rang entre 6,5 i 7,5, ajustats amb NaOH. Seguidament es filtren i es conserven a temperatura ambient.
- Aigua Milli-Q estèril.
- Preparació de DNA plasmídic d'interès.

METODOLOGIA

El procediment que s'explica a continuació és l'òptim per una placa de 10 cm de diàmetre. Per les plaques de 6 pous s'utilitza 1/5 dels volums esmentats.

1. Es sembren les cèl·lules un dia abans d'efectuar la transfecció, sobre un 20-30% de confluència, amb la finalitat que la densitat sigui l'adequada en el moment de la transfecció.
2. Unes hores abans de començar la transfecció, es canvia el medi de cultiu de les cèl·lules per medi fresc.
3. Es prepara la barreja de DNAs que es vol transfectar en tubs estèrils de 15 ml. Per una placa de 10 cm s'han barrejat 18 µg de DNA, 2 µg de GFP (per monitoritzar el

nivell de transfecció) i aigua Milli-Q estèril fins a un volum final de 250 µl. En cas que s'efectuï una transfecció doble, es barrejaran 9 µg de cada DNA.

4. S'afegeixen 250 µl del tampó de clorur de calci i es barreja bé fent lleugers cops a la base del tub.
5. Seguidament, s'afegeixen els 500 µl de barreja de DNA i clorur de calci a 500 µl de tampó fosfat, gota a gota, a la vegada que es creen bombolles a la mostra amb una pipeta de 2 ml i un pipetejador automàtic.
6. S'incuba la barreja a temperatura ambient (a la campana de cultius) durant 15 minuts i finalment, es posa gota a gota a la placa que conté les cèl·lules. Al mateix temps s'efectua un moviment de creu en aquesta placa perquè quedi tota la barreja ben repartida. Les cèl·lules s'incuben a 37°C durant 12-20 hores.
7. El següent dia s'observen les cèl·lules al microscopi per comprovar la seva integritat, ja que el procés de transfecció és lleugerament tòxic. A continuació es renta la placa 3 o 4 cops amb PBS 1X estèril, amb l'objectiu d'eliminar cèl·lules mortes i restes de precipitats suspesos en el medi i s'afegeix medi fresc. Les cèl·lules s'incuben a 37°C, 24 hores més.
8. El dia següent es monitoritza el nombre de cèl·lules transfectades en el citòmetre de flux (FACS), mesurant el número de cèl·lules que han incorporat GFP, així com es procedeix amb l'experiment que es vulgui realitzar.

3.3.2. Transfecció transitòria amb transfectina o lipofectamina 2000 en cèl·lules HeLa i HEK293.

MATERIALS I REACTIUS

- Medi de cultiu DMEM complet (10% FBS inactivat; 1% penicilina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Medi de cultiu Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (a un 70-80% de confluència).
- PBS 1X.
- Agent lipídic: transfectina (BioRad) o lipofectamina 2000 (Invitrogen).
- Aigua Milli-Q estèril.
- Preparació de DNA plasmídic d'interès.

METODOLOGIA

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

1. Es sembren les cèl·lules un dia abans, de manera que la confluència sigui del 70-80% en el moment de la transfecció, ja que per la transfecció amb agents lipídics es requereix una confluència alta perquè és un mètode bastant tòxic.
2. Es prepara una barreja amb el DNA i el medi Opti-MEM, utilitzant 2 µg de DNA en un volum final de 250 µl.
3. En un altre tub es prepara una barreja de l'agent lipídic en Opti-MEM. Així, també es prepara una barreja en un volum final de 250 µl i generalment s'utilitza una relació 1:1 de l'agent lipídic i el DNA. Per tant, si es transfecten 2 µg de DNA, s'utilitzarà 2 µl d'agent lipídic. En el cas de la transfectina, no necessita temps d'incubació per la formació de liposomes, però en el cas de la lipofectamina 2000 és necessari una incubació de 5-10 minuts a temperatura ambient.
4. S'ajunten les dues barreges (la del DNA i Opti-MEM amb la de l'agent lipídic i Opti-MEM) i s'incuben durant 20 minuts a temperatura ambient.
5. Mentre hi ha aquesta incubació, es retira el medi de cultiu de les plaques i es fa un rentat amb PBS 1X estèril amb l'objectiu d'eliminar traces d'antibiòtic. Després, s'afegeix 1,5 ml de medi Opti-MEM a cada pou i es deixa equilibrar a 37°C a l'incubador.
6. Un cop finalitzat el temps d'incubació, s'afegeix la barreja gota a gota a cada pou mentre es mou la placa en forma de creu de manera que quedi ben repartida.
7. S'incuba 4 hores a 37°C i després es retira el medi, es renten les cèl·lules amb PBS 1X estèril, de manera que s'eliminïn les restes d'agent lipídic i s'afegeixen 2 ml de medi DMEM complet. S'incuben les cèl·lules de 24 a 48 hores a 37°C perquè s'expressin les proteïnes.

3.3.3. Transfecció transitòria amb lipofectina en astròcits primaris de rata.

Els cultius primaris d'astròcits de rata presenten una baixa eficiència de transfecció i pateixen una alta mortalitat quan són transfectats. Per això, al grup es van provar diferents relacions de DNA:lipofectina així com diferents temps d'incubació per intentar reduir la mortalitat i aconseguir un nivell moderat de transfecció. S'ha utilitzat la lipofectina perquè prèviament en el grup es va testar que és l'agent lipídic amb el que s'aconsegueix obtenir un major nivell de transfecció.

MATERIALS I REACTIUS

- Medi de cultiu DMEM complet (10% FBS inactivat; 1% penicilina/estreptomicina; 1% glutamina) o amb Ara-C 4 µM.
- Medi de cultiu Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- Cultiu primari d'astròcits (70-80% de confluència).
- PBS 1X estèril.

- Agent lipídic: lipofectina (Invitrogen).
- Aigua Milli-Q estèril.
- Preparació de DNA plasmídic d'interès.

METODOLOGIA

Les quantitats de DNA que s'han transfectat han sigut 0,5 µg per pous d'una placa de 24 pous i 3 µg per pous d'una placa de 6 pous. S'ha utilitzat una relació DNA:lipofectina de 1:2. És important tenir en compte que es necessita un alt percentatge de confluència. La relació de cèl·lules ha d'estar al voltant de les 80.000 en el cas de les plaques de 24 pous i al voltant de les 400.000 cèl·lules en el cas de les plaques de 6 pous. El protocol que es detalla a continuació es per plaques de 24 pous.

1. Primer, es prepara la barreja de lipofectina en un volum final de 25 µl de Opti-MEM (1 µl de lipofectina + 24 µl d'Opti-MEM) i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient.
2. Mentrestant es prepara la barreja de DNA (0,5 µg) en 25 µl d'Opti-MEM.
3. S'ajunten les dues barreges i s'incuben durant 15 minuts a temperatura ambient.
4. Es retira el medi de les plaques, es renten amb PBS 1X estèril i s'afegeixen 150 µl d'Opti-MEM per pou. Finalment s'afegeixen els 50 µl de barreja final a les cèl·lules gota a gota i movent la placa.
5. S'incuba entre 1 i 3 hores, controlant la viabilitat de les cèl·lules. Finalment es canvia el medi de les cèl·lules per DMEM complet amb Ara C i es deixa entre 24 i 48 hores a 37°C a l'incubador.

3.3.4. Determinació de l'eficiència de transfecció per citometria de flux (FACS).

Per determinar l'eficiència de transfecció, el DNA exogen s'ha co-transfectat amb la *green fluorescent protein* (GFP). Aquesta proteïna emet fluorescència al ser excitada a una determinada longitud d'ona i pot ser detectada per mètodes fluoromètrics. D'aquesta manera, les cèl·lules transfectades amb GFP (i teòricament amb la resta de DNA exogen) es distingeixen de les no transfectades. Per passar les cèl·lules pel citòmetre de flux, és necessari que les cèl·lules estiguin tripsinitzades per evitar agregacions. Les cèl·lules tripsinitzades es resuspenen en medi fresc i es mantenen en tubs específics de citometria. S'utilitza un protocol que permet classificar les cèl·lules segons el grau de fluorescència. Durant aquesta Tesi, aquestes determinacions s'han realitzat en el Servei de Citometria de Flux dels Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona, al Campus de Bellvitge, seguint els protocols recomanats al mateix servei.

3.4. PRODUCCIÓ D'ADENOVIRUS.

Degut a la dificultat de transfectar astròcits primaris de rata s'ha decidit optar per la producció d'adenovirus que expressen les proteïnes d'interès per cada estudi o els miRNAs per obtenir els models cel·lulars determinats. Els adenovirus (AdVs) són relativament fàcils d'obtenir així com de manipular. A més a més, l'eficiència d'infecció és molt alta, aconseguint un nivell d'expressió de les proteïnes molt alt i pràcticament a totes les cèl·lules.

3.4.1. Adenovirus.

Els adenovirus són virus nus, icosaèdrics, amb fibres en els seus vèrtexs. El seu genoma, d'aproximadament 36 Kb, està constituït per una doble cadena lineal de DNA. El genoma dels adenovirus es divideix en gens primerencs (E1 a E4) i gens tardans (L1 a L5). Degut a que la capacitat del genoma adenoviral per dirigir la producció d'adenovirus resideix en les seqüències ubicades al gen E1, les estratègies per produir vectors adenovirals consisteixen en eliminar aquestes seqüències i incorporar en el seu lloc el gen d'interès, generant així un vector adenoviral sense capacitat de replicació. El posterior creixement i amplificació del vector es realitza utilitzant una línia cel·lular complementària, que conté la seqüència E1 en el seu genoma. Per últim, el vector adenoviral que conté el gen d'interès és linealitzat per un mecanisme mediat per un receptor, i una vegada a l'endosoma és lisat. El DNA viral contenint el gen d'interès és alliberat al citoplasma i accedeix al nucli on resideix com un DNA extracromosòmic (episoma), dirigint l'expressió del gen d'interès.

3.4.2. Producció d'adenovirus.

El sistema que s'ha utilitzat per a l'obtenció d'adenovirus és el *ViraPower Adenoviral Expression System* (Invitrogen). Aquest sistema permet crear adenovirus no replicatius ni integratius que són usats per a l'expressió temporal del gen d'interès, tant en cèl·lules eucariotes divisores com en les no divisores. S'obtenen uns *stocks* virals d'alt títol, els quals es poden amplificar i purificar. S'ha de tenir en compte que s'ha de treballar en condicions de Bioseguritat 2.

El vector d'expressió que s'ha utilitzat és el pAdV/CMV/V5-DEST compatible amb el sistema *Gateway* (Invitrogen), el qual conté els ITRs 5' i 3' i la senyal d'encapsidació necessaris per empaquetar el gen d'interès en els virions. La proteïna necessària per a l'expressió dels gens E1 està integrada a la línia cel·lular HEK293 en *trans*, la qual s'utilitza per a la seva producció.

METODOLOGIA

1. Primerament es construeixen els vectors d'expressió amb les seqüències d'interès en el vector pAdV/CMV/V5-DEST per el sistema *Gateway*, els quals són seqüenciats per confirmar que són correctes.
2. Amb la finalitat d'exposar els ITRs virals, es digereixen entre 5 i 10 µg del plàsmid que conté el gen d'interès amb l'enzim de restricció Pac I, a 37°C durant 12-16 hores. Es corre una petita alíquota en un gel d'agarosa per comprovar que la digestió ha funcionat i es purifica el plàsmid digerit. Es precipita amb l'objectiu de concentrar i purificar el DNA digerit obtingut i finalment es quantifica.
3. El dia abans de començar la producció, es sembren cèl·lules HEK293 (de passatge baix) en plaques de 6 pous, aproximadament a una densitat de 7×10^5 cèl·lules per pou, amb medi DMEM complet que conté aminoàcids no essencials (NE-AA) i s'incuben a 37°C a l'incubador durant 12-16 hores.
4. Es transfecta 1 µg de DNA digerit amb Pac I a les HEK293 amb lipofectamina 2000 utilitzant una relació de DNA:lipofectamina 2000 de 1:3, utilitzant Opti-MEM amb un 10% de FBS, ja que es deixa la transfecció durant tota la nit a l'incubador a 37°C.
5. El dia següent, es canvia el medi per DMEM complet amb NE-AA i es deixa incubar 24 hores més a l'incubador.
6. A les 48 hores post-transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i es transfereixen a una placa de 100 mm. Es deixen incubar durant 10-13 dies fins que s'obtingui un 80% d'efecte citopàtic. Durant els dies previs, es canvia el medi si és necessari i es va observant la producció de calves en el cultiu cel·lular.
7. Quant l'efecte citopàtic és del 80-100%, es recull el medi i les cèl·lules (cru viral) i es transfereixen a un tub de 15 ml ben resupeses.
8. Es fan 3 cicles de congelació (30 minuts a -80°C) i descongelació (15 minuts com a màxim a 37°C), i es centrifuga el lisat cel·lular durant 15 minuts a 3000 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars.
9. Es fan alíquotes amb el sobrenedant en criotubs que es guarden a -80°C. Encara que els *stocks* virals són bastant estables als processos de congelació/descongelació, és recomanable no usar *stocks* que hagin estat descongelats més de 10 vegades, atès que el seu títol haurà disminuït.

3.4.3. Amplificació i purificació d'adenovirus.

Els *stocks* virals es poden amplificar, i fins i tot purificar, amb l'objectiu d'obtenir un *stock* concentrat i més net, afavorint el seu ús en els casos on es necessita una multiplicitat d'infecció (MOI) molt alta, ja que els *stocks* virals estan compostos per les

partícules virals però, a més a més, per medi i per restes cel·lulars que poden interferir en determinats experiments.

METODOLOGIA

1. Es sembra una placa de 100 mm de diàmetre amb HEK293 de passatge baix amb medi DMEM complet amb NE-AA i s'infecta amb una MOI de 1 amb l'adenovirus a amplificar i/o purificar (la infecció es pot fer en cèl·lules en suspensió o adherides a la placa).
2. S'incuba de 2 a 4 dies fins que l'efecte citopàtic és complet. En aquest punt es pot procedir a recollir i tractar el cru viral com s'ha explicat en l'apartat anterior per obtenir un adenovirus amplificat o es pot procedir amb el protocol per obtenir un adenovirus purificat.
3. Es recull el medi i totes les cèl·lules directament de la placa i es posen en un tub de 15 ml. Es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts i es resuspèn el *pellet* de cèl·lules amb 0,8 ml de medi DMEM complet fresc en un tub *ependorf*.
4. Es lisen les cèl·lules amb 3 cicles consecutius de congelació (30 minuts a -80°C) i descongelació (15 minuts com a màxim a 37°C), barrejant-les enèrgicament.
5. Es centrifuga a 10000 rpm durant 10 minuts per descartar les restes cel·lulars i es transfereix el sobrenedant a un altre *ependorf*.
6. A partir d'aquí, s'utilitza el *Adeno-X Virus Mini Purification Kit* (Clontech) per la purificació del cru viral seguint les instruccions del fabricant.
7. S'equilibra la columna amb 0,4 ml de la solució d'equilibri, es centrifuga a 2000 rpm durant 5 minuts i es descarta el centrifugat.
8. S'aplica 0,4 ml del cru viral a la columna, es centrifuga a 2000 rpm durant 5 minuts i es descarta el centrifugat. Es repeteix el procés pels 0,4 ml de cru viral restants.
9. Es renta la columna amb 0,4 ml de la solució de rentat, es centrifuga a 2000 rpm durant 5 minuts i es descarta el centrifugat.
10. Es repeteix el procés de rentat 2 cops més.
11. Es diposita la columna en un tub *ependorf* nou i s'elueix el virus amb 0,4 ml de la solució d'elució centrifugant a 2000 rpm durant 5 minuts.
12. Es fan alíquotes i es guarda a -80°C .

3.4.4. Titulació d'adenovirus.

La titulació de les partícules virals es pot fer per 2 mètodes, depenent de si l'adenovirus que s'ha construït expressa una proteïna fluorescent o no. En el primer cas, el millor mètode de titulació és la citometria de flux, mitjançant l'ús del FACS, mentre que en els casos que no es pot mesurar la fluorescència, la titulació es fa per ELISA seguint un protocol descrit de tinció amb l'anticòs $\alpha\text{-Ad/hexon}$ (Majem et al.,

2006), que és una proteïna present en el virus. També es pot titular fent una tinció contra un epítot present en el gen d'interès extrapolant que l'expressió del gen d'interès és proporcional a la quantitat de virus produït.

Generalment, el títol s'obté utilitzant les mateixes cèl·lules de producció, les HEK293, però s'ha de tenir en compte que no tots el tipus cel·lulars s'infecten per igual. Per això, es poden titular els adenovirus amb qualsevol tipus de línia cel·lular.

3.4.4.1. Titulació per citometria de flux.

Aquest mètode es basa en el fet que l'adenovirus construït expressa una proteïna fluorescent que es pot detectar mitjançant el FACS. En aquesta Tesi s'ha utilitzat en els casos de la construcció d'adenovirus que expressen miRNAs contra les proteïnes MLC1 i GlialCAM ja que han estat construïts en vectors que porten incorporada la EmGFP.

METODOLOGIA

1. Es sembren cèl·lules HEK293 a una densitat de 100.000 cèl·lules per pou en una placa de 24 pous amb medi DMEM complet que conté NE-AA. S'incuben de 12 a 24 hores a l'incubador a 37°C.
2. Es retira el medi i s'afegeix el mínim volum possible (250 µl) a cada pou de medi DMEM complet amb NE-AA fresc. Així s'afavoreix que les partícules virals estiguin en contacte amb les cèl·lules.
3. S'infecta les cèl·lules amb el virus en una sèrie de dilucions (1/1000, 1/100 i 1/10) i directament de l'*stock* (1 µl, 10 µl i 100 µl). D'aquesta manera es cobreix el rang de títol. Es deixen incubar 12 hores a l'incubador a 37°C.
4. Es canvia el medi i s'incuba 24 hores més per tal de deixar temps suficient perquè s'expressin les proteïnes fluorescentes per les quals codifica el virus (és recomanable no sobrepassar aquest temps per evitar infeccions secundaries).
5. Es renten les cèl·lules 3 cops amb PBS 1X, es tripsinitzen amb 50 µl de tripsina i un cop aixecades s'afegeixen 500 µl de medi DMEM complet per desactivar la tripsina i es posen en un tub *ependorf*. Es centrifuguen 5 minuts a 1000 rpm, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* amb 600 µl de paraformaldehid al 4% en PBS 1X. Aquest últim pas és important per tal de fixar les cèl·lules i no contaminar el citòmetre de flux.

El títol es calcula amb la següent fórmula i es dona en *Transduction Units/ml* (TU/ml):

$$\text{TU/ml} = \text{dilució} \times \% \text{ cèl·lules fluorescentes} \times 1000$$

on el % de cèl·lules fluorescentes és el valor de % que s'obté del citòmetre en funció del número de cèl·lules sembrades.

3.4.4.2. Titulació pel mètode de l' α -hexon.

Aquest mètode es basa en una immunocitoquímica de cèl·lules utilitzant un híbridoma 2Hx-2, encara que també es pot realitzar el mètode amb qualsevol altre anticòs.

METODOLOGIA

1. Es sembren cèl·lules HEK293 a una densitat de 40.000 cèl·lules per pou en una placa de 96 pous, amb medi DMEM que conté NE-AA. S'incuben de 12 a 24 hores a l'incubador a 37°C.
2. Es preparen dilucions seriades (1/10) de l'*stock* viral en un volum final de 100 μ l de medi DMEM complet + NE-AA. És important canviar la punta cada vegada que es passa d'un pou a un altre, ja que poden arrossegar partícules virals i no es faria correctament la dilució seriada. S'incuben les cèl·lules de 24 a 48 hores a 37°C.
3. Després de la incubació, es retira el medi acuradament per no trencar la monocapa de cèl·lules. Es deixa assecar 5 minuts a l'aire.
4. Es fixen les cèl·lules afegint 100 μ l/pou de metanol 100% fred i s'incuba durant 15 minuts a -20°C.
5. S'aspira el metanol amb compte i es renten les cèl·lules 2 cops amb 100 μ l/pou amb PBS²⁺, que conté Ca²⁺ i Mg²⁺, fet que afavoreix que les cèl·lules no es desenganxin.
6. S'incuba amb l'anticòs primari (1/5 si és l' α -2Hx-2 o 1/100 si és el cas d'un altre anticòs primari) en 50 μ l de solució de bloqueig (PBS²⁺, 1% BSA), evitant la formació de bombolles. S'incuba d'1 a 2 hores a 37°C o tota la nit a 4°C. Si s'utilitza un anticòs diferent a l' α -2Hx-2, i necessita que les cèl·lules siguin permeabilitzades, es realitza un pas de permeabilització, incubant les cèl·lules durant 15 minuts amb PBS 1X, 0,1% Triton X-100 abans de l'incubació amb l'anticòs primari.
7. Es renten les cèl·lules 3 cops amb PBS²⁺, 1% BSA.
8. S'incuben amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor a una dilució 1/500 en PBS²⁺, 1% BSA, durant 1-2 hores a 37°C i protegit de la llum. En el cas d'utilitzar l'híbridoma de l' α -2Hx-2, s'utilitza un anticòs secundari *anti-mouse*.
9. Es renten les cèl·lules 3 cops amb PBS²⁺, 1% BSA i es quantifiquen les cèl·lules fluorescents en un microscopi invertit de fluorescència.

Si s'observa un núvol de cèl·lules fluorescents, es compta com a una sola cèl·lula ja que suggereix que hi ha hagut una infecció secundària. Es fa el recompte en la dilució on hi hagi més cèl·lules positives que es puguin comptar, encara que és recomanable que per cada *stock* viral s'utilitzi la mitja de diferents dilucions per calcular el títol. És important tenir en compte que s'han utilitzat 100 μ l per cada dilució, per tant, s'ha d'aplicar un factor de 10X per obtenir el títol correcte en TU/ml. Per exemple, si es

compten 100 cèl·lules positives a la dilució 10^{-5} , això són 1×10^7 / 100 μ l i per tant, un títol de 10^8 TU/ml.

ADENOVIRUS PRODUÏTS	TÍTOL (TU / ml)	ADENOVIRUS AMPLIFICATS	TÍTOL (TU / ml)
miRNA 523-EmGFP GlialCAM	$4,8 \cdot 10^8$	HA hMLC1 HA loop	$5 \cdot 10^8$
miRNA 908-EmGFP GlialCAM	$4,8 \cdot 10^7$	miRNA SCR-EmGFP	$4,5 \cdot 10^8$
miRNA 1392-EmGFP GlialCAM	$9,6 \cdot 10^7$	miRNA 756-EmGFP MLC1	$1,5 \cdot 10^8$
hCIC-2-3xHA	$5 \cdot 10^6$	miRNA 905-EmGFP MLC1	$3,5 \cdot 10^8$
		miRNA SCR-Cherry	$1 \cdot 10^7$
		miRNA 905-Cherry MLC1	$1 \cdot 10^7$
		GlialCAM-3xFlag	$5 \cdot 10^8$

ADENOVIRUS PURIFICATS	TÍTOL (TU / ml)
miRNA SCR-EmGFP	$5 \cdot 10^9$
miRNA 908-EmGFP GlialCAM	$4,7 \cdot 10^9$
miRNA 1392-EmGFP GlialCAM	$4,6 \cdot 10^9$
miRNA SCR-Cherry	$1 \cdot 10^9$
miRNA 905-Cherry MLC1	$1 \cdot 10^9$

Taula 3. Adenovirus. Taula on es mostren els adenovirus produïts, així com els amplificats i/o purificats. Es mostren els títols obtinguts en cada cas en TU/ml.

3.5. TRANSDUCCIÓ D'ASTRÒCITS AMB ADENOVIRUS.

Per infectar astròcits amb adenovirus, el procediment rutinari ha sigut el següent.

1. Un cop aconseguit el cultiu pur d'astròcits després de l'agitació durant tota la nit, els astròcits es tripsinitzen i es sembren en el tipus de plaques adequades segons l'experiment que es vulgui realitzar. Així per exemple, si es vol realitzar un anàlisi de l'expressió per WB, s'han de sembrar els astròcits en plaques de 6 pous, si es vol extreure RNA s'han de sembrar en plaques de 100 mm de diàmetre i si es vol realitzar immunocitoquímiques, s'han de sembrar en plaques de 24 pous. Habitualment la densitat de les cèl·lules per placa ha sigut la següent: 50.000-85.000 cèl·lules en plaques de 24 pous, 200.000-300.000 cèl·lules en plaques de 6 pous i 10^6 cèl·lules en plaques de 100 mm de diàmetre. Després de la sembra es deixen entre 3 i 5 dies fins que les cèl·lules arriben a un 85% de confluència i s'afegeix Ara C al medi. El cultiu es deixa amb medi DMEM complet + Ara C durant 3 setmanes a l'incubador a 37°C i el medi es va canviant cada 3 o 4 dies.
2. Abans que el cultiu compleixi les 3 setmanes s'efectua la infecció dels astròcits amb els adenovirus. Per això, s'elimina una mica de medi dels pous i s'afegeixen els adenovirus a la MOI d'infecció adequada. En cada tipus d'experiment, tant la MOI d'infecció com el dia en que s'ha infectat els astròcits ha sigut diferent. Habitualment per adenovirus que expressen les proteïnes d'interès (MLC1, GlialCAM, CIC-2, etc.), s'ha utilitzat una MOI de 2-3 i la infecció s'ha dut a terme 2 dies abans que el cultiu compleixi 3 setmanes. En canvi, quan s'han generat els

models *knock-down* de malaltia en astròcits, mitjançant els adenovirus que expressen miRNA contra MLC1 o contra GlialCAM, s'ha hagut de conèixer la mínima MOI necessària per eliminar els nivells de les proteïnes d'interès i els dies que es requereixen perquè això es produeixi. En el cas dels miRNAs contra MLC1, la infecció s'ha fet a MOI 5, entre 5-6 dies abans de les 3 setmanes de cultiu. En canvi, els miRNAs contra GlialCAM necessiten d'una infecció a MOI 10, 7 dies abans de les 3 setmanes de cultiu. En el cas que s'hagi complementat el model *knock-down* amb l'expressió d'alguna proteïna, primer s'ha portat a terme la infecció amb l'adenovirus que expressa el miRNA i posteriorment la infecció amb l'adenovirus d'expressió de la proteïna corresponent, mantenint els temps i les MOI d'infecció determinats en cada cas.

3. El dia següent a la infecció, es retira el medi i es renten els astròcits amb PBS 1X estèril, amb la finalitat d'eliminar les restes virals que puguin quedar. Es torna a afegir medi DMEM complet + Ara C i s'incuben a l'incubador a 37°C fins que siguin processats.

3.6. MONITORITZACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR PER FLUORESCÈNCIA MITJANÇANT CALCEÏNA.

Existeixen diferents tècniques per mesurar els canvis en el volum cel·lular. Aquestes tècniques es poden agrupar en 2 grans grups: les mesures òptiques o electrofisiològiques, les quals monitoritzen els canvis en la concentració de substàncies introduïdes dins les cèl·lules; i les tècniques basades en els mètodes morfomètrics, les quals inclouen reconstruccions tridimensionals de seccions o mesures dels canvis en una o dues dimensions.

S'han volgut monitoritzar canvis en el volum del cultiu primari d'astròcits, utilitzant una tècnica no invasiva de mesura òptica dels canvis de concentració de calceïna, un colorant fluorescent atrapat dins les cèl·lules.

La *Calcein AM* (Invitrogen) és un marcador fluorescent que s'excita a 485 nm i emet a 530 nm (color verd). Les modificacions que s'han fet en els àcids carboxílics de la calceïna amb esters acetoximetílics (AM) provoquen que la molècula perdi la càrrega i pugui travessar la membrana cel·lular. Un cop dins la cèl·lula, la calceïna és hidrolitzada per esterases endògenes que la carreguen negativament i això fa que quedi retinguda en el citoplasma cel·lular. Els canvis en la intensitat de fluorescència que s'observen amb aquesta tècnica són proporcionals als canvis de concentració de la calceïna, que a la vegada són inversament proporcionals als canvis de volum d'aigua cel·lular (Comes et al., 2006; Crowe et al., 1995; Ford et al., 2005).

Per monitoritzar el volum cel·lular dels cultius primaris d'astròcits mitjançant la tècnica de la calceïna, s'han de tenir en compte els següents aspectes:

1) La calceïna presenta cert *photobleaching* degut a que les repetides exposicions al làser del microscopi provoquen una caiguda progressiva de la fluorescència. Un cop obtinguda la cinètica d'intensitat de fluorescència per cada regió d'interès (ROI) a cada temps, s'ha d'aplicar una fórmula matemàtica per tal de corregir els valors de caiguda de fluorescència provocats pel *photobleaching* de la calceïna.

2) El perfil de fluorescència que s'obté amb astròcits primaris és contrari al perfil esperat. El perfil esperat per les característiques de la calceïna, és un augment de la intensitat de fluorescència com a conseqüència de l'augment de concentració de calceïna a la cèl·lula, degut a la sortida d'aigua provocada per les condicions hiperosmòtiques del medi. Per altra banda, s'espera una disminució de la intensitat de fluorescència com a conseqüència de la dilució de la calceïna a la cèl·lula, deguda a l'entrada d'aigua provocada per les condicions d'hipoosmolaritat del medi. En astròcits, la calceïna es compartimentalitza i experimenta un fenomen anomenat *self-quenching* que provoca l'efecte contrari en el perfil d'intensitat de fluorescència. En condicions d'hiperosmolaritat la fluorescència disminueix i en condicions d'hipoosmolaritat la fluorescència augmenta (Ford et al., 2005; Hamann et al., 2002; Solenov et al., 2004).

En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per estudiar el mecanisme de regulació del volum *regulatory volume decrease* (RVD), que és el mecanisme de recuperació del volum inicial cel·lular en condicions d'hipoosmolaritat (Benfenati et al., 2011).

MATERIALS I REACTIUS

- Solució fisiològica (122 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 0,4 mM MgSO₂; 1,3 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 10 mM glucosa; pH 7,2; 300 mOsm/kg aigua).
- Solució hiposmòtica (60 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 0,4 mM MgSO₂; 1,3 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 10 mM glucosa; pH 7,2; 180 mOsm/kg aigua).
- Osmòmetre (*Vapor Pressure Osmometer*, WESCOR).
- Cambra d'imatge (*SA-OLY/2*, Warner Instruments).
- Sistema de perfusió.
- Microscopi (*Olympus DSU spinning-disk*).
- *Software* d'adquisició *Cell-R* (Olympus).
- *Software* de tractament de dades *Prism* (GraphPad).
- *Calcein AM* (Invitrogen).
- Cèl·lules sembrades en cubre-objectes.

METODOLOGIA

1. Es procedeix al cultiu primari d'astròcits de rata sembrats en cobreobjectes, el tractament amb Ara C durant 3 setmanes i la infecció amb els adenovirus corresponents segons l'experiment.
2. Es renten els astròcits 5 minuts amb el tampó fisiològic i seguidament, s'incuben 10 minuts amb tampó fisiològic que conté *Calcein AM* a una concentració de 2 µM. Abans de continuar, es controla el nivell de fluorescència de les cèl·lules al microscopi per comprovar que la càrrega amb calceïna ha funcionat.
3. Es renten 2 cops més amb tampó fisiològic per treure l'excés de calceïna i es munta el cobreobjectes a la cambra d'imatge amb les cèl·lules cara amunt. S'ha de realitzar el muntatge ràpidament per tal que les cèl·lules no s'assequin.
4. S'instal·la el sistema de perfusió i es regula el flux amb tampó fisiològic a 50 µl/segon aproximadament. Un cop estabilitzat, es procedeix a fer les mesures de fluorescència. Primer, s'enfoca el pla de les cèl·lules a 488 nm, i es dissenya el programa d'adquisició de fotos a diferents temps. El protocol experimental utilitzat ha estat el següent: incubació dels astròcits 5 minuts en tampó fisiològic, 30 minuts en tampó hipoosmòtic i 5 minuts en tampó fisiològic, adquirint imatges cada 30 segons.
5. Un cop acabat el protocol es determinen diferents regions d'interès (ROI) a les cèl·lules i es calcula la cinètica d'intensitat de fluorescència de cada ROI a cada temps ($\Delta F/F$). Aquest càlcul s'ha obtingut amb el *software* d'adquisició *Cell-R* (Olympus).
6. Un cop obtingudes les dades crues d'intensitat de fluorescència, es corregeix la caiguda de fluorescència causada pel *photobleaching* de la calceïna. S'ajusten les dades obtingudes a temps d'incubació amb medi fisiològic, a una equació exponencial de caiguda en una fase ($y = a \cdot e^{-kt} + b$) utilitzant el *software Prism* (GraphPad), on s'obtenen els valors de les constants de l'equació (a, k, b). Per corregir la intensitat de fluorescència en cada punt, de cada ROI, s'utilitza la següent fórmula matemàtica:

$$Y_{\text{corr}} = X_{Y_{\text{fis}}} - [a \cdot e^{-kt} + b] + Y$$

on:

Y_{corr} : valor d'intensitat de fluorescència corregida d'una ROI concreta en un temps determinat.

$X_{Y_{\text{fis}}}$ o valor de *deriva*: Mitjana dels valors d'intensitat de fluorescència dels temps en que la cèl·lula està en presència de medi fisiològic, en una determinada ROI.

a o valor de *span*: valor d'ajust obtingut en l'equació exponencial de caiguda en una fase.

k: constant de caiguda obtinguda en l'equació exponencial de caiguda en una fase.

t: temps.

b o valor de *plateau*: valor d'ajust obtingut en l'equació exponencial de caiguda en una fase.

Y: valor d'intensitat de fluorescència d'una ROI concreta en un temps determinat.

7. Un cop corregides, les dades són relativitzades respecte el valor de deriva de cada ROI, així s'obté una representació on la intensitat de fluorescència en tampó fisiològic és 1.

3.7. MESURA DEL FLUX DE SORTIDA CEL·LULAR DEL D-H³-ASPARTAT.

El dany cerebral durant estats patològics és parcialment degut a la sortida d'aminoàcids excitatoris (EAAs), com el *L*-glutamat i el *L*-aspartat, que provoquen la mort neuronal. Els astròcits són les cèl·lules encarregades de captar aquests aminoàcids, però en condicions patològiques poden deixar sortir alguns EAAs com la taurina, l'aspartat o el glutamat, mitjançant el mecanisme de RVD. Per tant, una forma d'estudiar aquest mecanisme és monitoritzant el flux de sortida d'alguns d'aquests EAAs en presència d'una solució hipoosmòtica. En aquest treball s'ha realitzat la monitorització del flux de sortida de l'aminoàcid *D*-aspartat marcat radioactivament amb triti (H³), en condicions d'hipoosmolaritat en astròcits en cultiu (Kimelberg et al., 1990; Rutledge and Kimelberg, 1996).

El triti emet raigs β febles, la seva vida mitja és de 12,3 anys i el rang en aire de 6 mm. Per això està considerat un isòtop no perillós, atès que es genera de manera espontània. Tot i això, s'ha treballat amb les condicions de seguretat necessàries i amb el material i les instal·lacions apropiades a les dependències de la instal·lació radioactiva (IRA-2105) del campus de Ciències de la Salut de Bellvitge.

MATERIALS I REACTIUS

- Solució fisiològica (122 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 0,4 mM MgSO₂; 1,3 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 10 mM glucosa; pH 7,2; 300 mOsm/kg aigua).
- Solució hipoosmòtica (60 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 0,4 mM MgSO₂; 1,3 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 10 mM glucosa; pH 7,2; 180 mOsm/kg aigua).
- Solució fisiològica de càrrega (solució fisiològica complementada amb 100 μM àcid *D*-aspartic (Fluka) i 5 μCi d'àcid D-[1,3-H³]-aspàrtic (1 mCi/ml, activitat específica 11,3 Ci/mmol, Perkin Elmer).
- Osmòmetre (*Vapor pressure osmometer*, Wescor).
- Sala de cultius radioactius (instal·lacions IRA-2105).
- Comptador de centelleig.
- Vials i líquid de centelleig (Ecoscint H, National Diagnostics).

- Solució de lisi (100 mM NaOH; 0,1% SDS).
- Solució comercial BCA (Pierce).

METODOLOGIA

A) Prova de càrrega.

Abans de començar pròpiament amb els experiments, s'ha de realitzar un control de càrrega per tal de determinar el temps necessari perquè les cèl·lules captin el màxim de radioactivitat possible. La càrrega depèn del tipus cel·lular que s'utilitza i per això s'ha de realitzar amb el mateix tipus cel·lular amb que es pretén realitzar els experiments. En aquest cas es tracta de cultius primaris d'astròcits cultivats 3 setmanes amb Ara C. Les mostres es tracten per triplicat.

1. Es sembren els astròcits en plaques de 24 pous i es cultiven 3 setmanes amb Ara C.
2. Es realitzen 3 rentats amb solució fisiològica temperada a 37°C.
3. S'afegeixen 500 µl de la solució fisiològica de càrrega a cada pou i es deixa incubar a diferents temps a l'incubador a 37°C. Els temps d'incubació han sigut 0, 1, 6, 14 i 24 hores.
4. Es renten les cèl·lules 3 cops amb solució fisiològica.
5. Es lisen els astròcits amb 100 µl de la solució de lisi, pipetejant fins que la mostra perdi la viscositat.
6. S'afegeix una alíquota de 50 µl de lisat en els vials de centelleig amb 3 ml de líquid de centelleig, i 10 µl de lisat es destinen a valorar la concentració de proteïna pel mètode de BCA.
7. Es posen els vials al comptador de centelleig per obtenir les comptes per minut (CPM) amb el programa del triti (3H 1 min).
8. Després de realitzar aquesta prova s'ha obtingut que el temps òptim de càrrega dels astròcits és de 6 hores.

B) Mesura del flux de sortida d'aspartat.

Per cada grup a estudiar i per cada condició experimental s'ha de treballar amb triplicats de les mostres. S'ha realitzat l'estudi en condicions fisiològiques i hipoosmòtiques.

1. Es sembren els astròcits en plaques de 24 pous i es cultiven 3 setmanes amb Ara C.
2. Es renten els astròcits 3 cops amb solució fisiològica.
3. S'afegeixen 500 µl per pou de la solució fisiològica de càrrega i s'incuba durant 6 hores a l'incubador a 37°C.
4. Després de la càrrega, es renten 3 cops els astròcits amb solució fisiològica.

5. S'afegeixen 300 µl per pou de solució fisiològica o hipoosmòtica segons la condició experimental.
6. S'agafen alíquotes de 20 µl del medi a diferents temps (0, 1, 2,5, 5, 10 i 20 minuts) i es posen en vials de centelleig amb 3 ml de líquid de centelleig.
7. Quan ha acabat el protocol d'incubació, s'agafa la resta de medi que queda i es posa en vials de centelleig amb 3 ml de líquid de centelleig.
8. Es lisen les cèl·lules amb 100 µl de la solució de lisi, pipetejant fins que la mostra perdi la viscositat. D'aquest lisat s'agafen 70 µl i es posen en vials de centelleig amb 3 ml de líquid de centelleig.
9. Es compten les comptes per minut (CPM) de tots els vials de centelleig obtinguts.
10. Es valora la concentració de proteïna de cada pou amb 10 µl de lisat mitjançant el mètode de BCA.
11. Es calcula el percentatge de sortida d'aspartat radioactiu comparant la quantitat d'aspartat radioactiu que hi ha al medi (que ha sortit de la cèl·lula) en cada temps, respecte el total de càrrega que hi ha hagut en aquell cultiu. Per obtenir el valor de càrrega total de cada cultiu, s'ha de sumar les CPM obtingudes a les alíquotes de 20 µl de cada temps, les CPM obtingudes a la resta de medi que s'ha agafat en acabar l'experiment i finalment, les CPM obtingudes del lisat que corresponen a la radioactivitat que no ha sortit de la cèl·lula (tenint en compte el volum inicial del lisat). A més a més, la càrrega total es normalitza per la concentració de proteïna per comprovar que la càrrega és homogènia entre les mostres del mateix grup i entre els diferents grups.

4. TÈCNiques RELACIONADES AMB ELS OÒCITS DE XENOPUS.

Els oòcits de les granotes africanes *Xenopus laevis* s'utilitzen com a model d'estudi d'expressió i caracterització de diferents tipus de proteïnes incloent canals i transportadors iònics. Es poden realitzar diferents tipus d'estudis segons el tipus de proteïna que es vulgui estudiar (entrada i/o sortida de molècules, senyalització de calci, estudis bioquímics, etc.). Però la metodologia més utilitzada en oòcits de *Xenopus* és la d'estudis electrofisiològics sobre el funcionament dels canals iònics cel·lulars (Bossi et al., 2007; Musa-Aziz et al., 2010).

Bàsicament hi ha tres raons fonamentals per les quals els oòcits són un model vàlid per aquests tipus d'estudis:

- 1) Tenen una gran mida cel·lular (aproximadament 1 mm de diàmetre).
- 2) Tenen la capacitat de produir proteïnes a partir de mRNA o cRNA exogen microinjectats, amb modificacions post-traduccionals pròximes a l'estat fisiològic.
- 3) La membrana dels oòcits conté canals i transportadors endògens que habitualment tenen una activitat de menor magnitud que l'activitat que generen els canals i transportadors exògens microinjectats.

En aquest treball s'han utilitzat els oòcits de *Xenopus* en els estudis funcionals de MLC1 per provar la seva relació amb el transport d'aigua.

4.1. MANIPULACIÓ DE LES GRANOTES I OBTENCIÓ D'OÒCITS.

El protocol utilitzat en la manipulació i en l'operació de les granotes per obtenir els oòcits està aprovat pel comitè ètic de la Universitat de Barcelona i l'Estabulari de Bellvitge.

MATERIALS I REACTIUS

- Material de cirurgia.
- Càpsules de Petri.
- Fil i agulla de sutura.
- Granotes *Xenopus laevis*.
- Solució MS-222, *Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate* (Sigma)
- Solució ORII (82,5 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; pH 7,4 amb TRIS) autoclavada.
- Solució Barth (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,82 mM MgSO₄; 0,4 mM CaCl₂; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 2,4 mM NaHCO₃; 10 mM Hepes; pH 7,5 amb TRIS; 10 mg/ml Gentamicina) autoclavada.
- Colagenasa D (Boehringer-Mannheim)

METODOLOGIA

S'han utilitzat granotes d'uns 110 mm de longitud, que es mantenen en tancs d'aigua amb 15-20 litres d'aigua per granota. Els amfibis es sotmeten a cicles de llum/foscor de 12 hores en una habitació termoestabilitzada a 19-21°C. S'alimenten dos cops per setmana amb pinso i cor de vaca i es canvia l'aigua dels tancs dos cops per setmana.

1. Per les operacions s'agafa una granota que no hagi sigut operada durant l'últim mes. Es col·loca en 1 litre de solució anestèsica MS-222 1 g/l preparada en aigua de l'aixeta.
2. Es deixa la granota aproximadament 20 minuts en aquesta solució fins que presenta símptomes d'estar anestesiada. Es renta sota l'aixeta per treure l'excés de MS-222 i es col·loca l'animal, cara amunt, en un llit de gel cobert amb paper mullat per mantenir-lo anestesiàt. També es col·loquen papers mullats a sobre el cap i les potes de la granota per evitar la dessecació.
3. Es fa un petit tall d'aproximadament 1 cm a la pell externa de l'abdomen i un altre d'aproximadament 0,5 cm a la pell interna i la capa muscular.
4. Amb l'ajuda d'unes pinces s'extreuen els lòbuls ovàrics de l'abdomen. S'agafa la quantitat necessària però no s'extreuen tots ja que es pot causar dany a la granota.
5. Els lòbuls obtinguts es posen a una placa de Petri que conté solució ORII i amb l'ajuda d'unes tisores, es procedeix a fer una disgregació mecànica fent grups d'òocits el més petit possibles (1 cm).
6. Per finalitzar l'operació de la granota, es cus la capa muscular juntament amb la pell interna amb 2-3 punts de sutura i la pell externa amb 4-5 punts de sutura. L'animal es renta amb aigua de l'aixeta i es deixa amb aquesta mateixa aigua 10-15 minuts fins que passa l'efecte de l'anestèsia. Generalment cada granota pot ser operada entre 6 i 10 vegades fins que deixa de produir òocits.
7. Els grups d'òocits es posen en un tub de 15 ml estèril fins que arriben a la mesura de 3 ml i s'hi afegeix 10 ml de solució ORII que conté col·lagenasa D a una concentració de 2 mg/ml. Aquest tractament es realitza per obtenir òocits aïllats i eliminar les capes fol·liculars.
8. S'efectuen 2 incubacions de 90 minuts cadascuna amb la solució de col·lagenasa, amb agitació orbital de baixa velocitat (20 rpm) a 17°C. Els temps de les incubacions poden variar si no s'obtenen òocits aïllats, tenint en compte que una llarga exposició amb col·lagenasa resulta tòxica pels òocits.
9. Es realitzen 4-6 rentats dels òocits amb solució ORII, canviant delicadament el medi amb una pipeta *Pasteur* acoblada a la una bomba de buit.

10. Es realitzen 4-6 rentats dels oòcits amb solució Barth de la mateixa manera que anteriorment.
11. Un cop aïllats, els oòcits es classifiquen en aptes i no aptes per la injecció mitjançant una lupa (**Figura 36**). Els oòcits seleccionats s'incuben en medi Barth durant 12-16 hores a un incubador a 17°C.

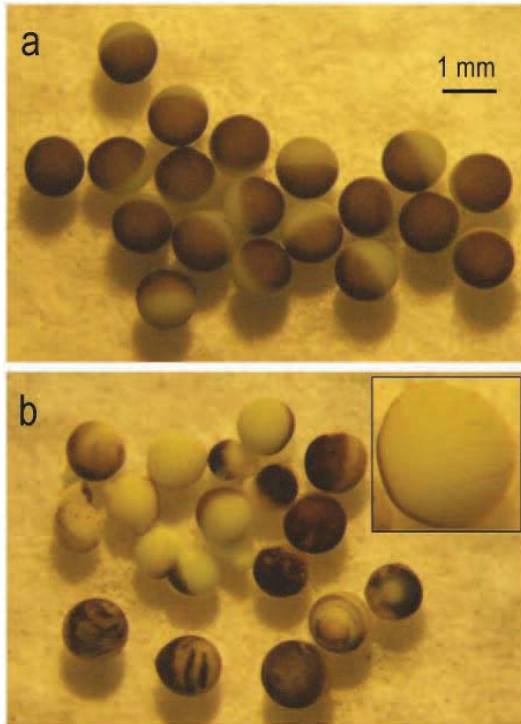


Figura 36. Oòcits de *Xenopus laevis* aïllats i classificats. Els oòcits aptes per la injecció (a), presenten un pol animal pigmentat de color marró o negre, un pol vegetal de color groguenc i una mida d'entre 1 i 1,2 mm de diàmetre. En canvi els oòcits no aptes per la injecció (b) presenten malformacions o han explotat pel tractament i deficiències en la pigmentació dels pols. Imatge extreta de (Musa-Aziz et al., 2010).

4.2. MICROINJECCIÓ DE cRNAs.

MATERIALS I REACTIUS

- cRNAs comprovats i de concentració coneguda.
- Oòcits de *Xenopus* aïllats i seleccionats.
- Puller *Inject+Matic-puller* (Genève).
- Injector semiautomàtic *Inject+Matic-system* (Genève).
- Micropipetes de vidre *Microcaps 6.66µl capacity* (Drummond).
- Solució Barth (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,82 mM MgSO₄; 0,4 mM CaCl₂; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 2,4 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES; pH 7,5 amb TRIS; 10 mg/ml Gentamicina) autoclavada.
- Aigua DEPC.

METODOLOGIA

1. Es preparen els cRNAs que s'han d'injectar als oòcits fent una dilució amb aigua DEPC, tenint en compte que s'injecta un volum de 50 nl per oòcit i que habitualment s'injecten 10 ng de cRNA per oòcit.

2. Es fabriquen les micropipetes de vidre amb el puller i se'n col·loca una a l'injector semiautomàtic. Amb l'ajuda d'unes pinces, s'obre la punta de la pipeta per crear un porus adequat per injectar 50 nl sense quedar obturat, tenint en compte que si és massa gran injectarà més de 50 nl.
3. A sota una lupa, es comprova que el porus de la pipeta s'ha obert, aplicant pressió a dins una bombolla d'uns 50 µl d'aigua DEPC i observant que es formen bombolles d'aire. Es calibra l'aparell i la pipeta, variant el temps d'injecció i la pressió d'injecció de l'aparell segons el diàmetre del porus de la punta de la pipeta. Això es fa utilitzant un paper mil·limetrat i agafant i injectant aigua DEPC dins la gota fins que es tenen els paràmetres adequats per injectar 50 nl de líquid en cada injecció.
4. S'injecten els grups d'oòcits corresponents amb cada cRNA. En el cas del grup de control negatiu (W), s'injecten 50 nl d'aigua DEPC. Habitualment, s'injecten entre 30-40 oòcits per grup experimental. La injecció es realitza amb l'ajuda d'una reixeta acoblada a una placa que impedeix el moviment lliure del oòcits i sempre en presència de medi Barth.
5. Un cop injectats, s'incuben els oòcits en medi Barth a l'incubador a 17°C fins a última hora de la tarda.
6. Es classifiquen els oòcits injectats i s'eliminen aquells que hagin estat danyats, ja que afecten als que continuen sans.
7. S'incuben 12-16 hores més en medi Barth a 17°C i es realitza un altre control de mortalitat.
8. Finalment, 24-48 hores després de la injecció es procedeix a realitzar l'experiment ja que es considera que la proteïna ja s'ha pogut expressar.

4.3. MESURA DE LA PERMEABILITAT OSMÒTICA DE L'AIGUA.

L'aigua pot travessar lentament les membranes cel·lulars per difusió a través de la membrana lipídica, però també existeix un transport ràpid a través de proteïnes especialitzades en el transport d'aigua. Aquest flux d'aigua succeeix contínuament entre els compartiments del cervell i es troba estrictament regulat. No obstant, en condicions patològiques pot ser desregulat i comportar conseqüències, com ara la formació d'edema o hidrocefàlia. No es coneix amb exactitud els mecanismes moleculars del transport d'aigua en el cervell, tot i que s'ha identificat la proteïna aquaporina 4 (AQP4) com una de les implicades en la formació de l'edema cerebral (Zador et al., 2007, 2009). A més a més, s'ha observat que proteïnes de membrana com els cotransportadors KCC i NKCC1, el transportador de glutamat glial EAAT1 o els transportadors de glucosa GLUT1 i GLUT2 entre altres, són capaços de transportar

aigua directa o indirectament (Hamann et al., 2005; MacAulay et al., 2001; Zeuthen, 1994; Zeuthen et al., 2007).

Per tant, ja que MLC presenta una desregulació de l'homeòstasi de l'aigua i la formació d'edema cerebral, s'ha volgut provar si MLC1 és una proteïna implicada en el transport d'aigua. Per això s'ha fet l'assaig de mesura de la permeabilitat osmòtica de l'aigua en oòcits de *Xenopus* (Tingaud-Sequeira et al., 2008, 2010).

MATERIALS I REACTIUS

- Oòcits de *Xenopus* degudament injectats amb el cRNA corresponent a cada grup experimental.
- Solució Barth (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,82 mM MgSO₄; 0,4 mM CaCl₂; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 2,4 mM NaHCO₃; 10 mM Hepes; pH 7,5 amb TRIS; 10 mg/ml Gentamicina 200 mOsm/Kg d'aigua) autoclavada.
- Solució Barth diluïda fins a 72 mOsm/Kg d'aigua.
- Estereomicroscopi de llum transmesa *Stereomicroscope SMZ800* (Nikon).
- Càmera digital *Digital sight DS2Mv* (Nikon).
- Software d'adquisició d'imatges *NIS-Elements* (Nikon).
- Software de tractament d'imatges *ImageJ*.

METODOLOGIA

Aquesta metodologia es realitza utilitzant com a mínim 10 oòcits per grup experimental.

1. Es col·loca un oòcit injectat amb el cRNA corresponent en una placa de Petri que conté Barth hipoosmòtic a 72 mOsm/Kg d'aigua. Aquesta placa es situa sota un estereomicroscopi que produeix el feix de llum per sota la placa, així s'observa millor el contorn exacte de l'oòcit ja que es visualitza com una esfera de color negre. Ràpidament s'enfoca la lupa i es comença l'experiment.
2. La lupa està connectada a una càmera digital que segueix l'evolució de l'oòcit cada cert temps. Així, mitjançant el *software NIS-Elements* s'ha programat un protocol de 4 minuts on es fan fotografies cada 5 segons durant el primer minut i cada minut fins els 4 minuts.
3. Un cop acabat el protocol de *time course*, si l'efecte d'hipoosmolaritat no ha provocat l'explosió de l'oòcit, es pot guardar per realitzar un WB i comprovar que la proteïna injectada s'està expressant.
4. Es realitza el tractament de les fotografies per obtenir el valor de l'àrea de cada oòcit en cada temps de l'experiment mitjançant el *software ImageJ*. Per obtenir l'àrea en cm² s'ha de calibrar la imatge per saber quants píxels corresponen a 1 mm. Per fer això, es mesura el diàmetre de l'oòcit a temps 0, en píxels i s'assigna que és igual a 1,3 mm, que és el diàmetre mig conegut d'un oòcit de *Xenopus*.

5. Amb les àrees obtingudes de cada oòcit a cada temps es calcula el valor de permeabilitat de l'aigua (**Pf**) seguint el següent tractament matemàtic:

Primer es calcula el volum en cm^3 de cada oòcit a cada temps:

$$V = \frac{4}{3} \times A \times \sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

on **A** és l'àrea en cm^2 i $\pi = 3,141592$

Seguidament es representen els canvis de volum respecte el temps en una gràfica i s'assigna una línia de tendència corresponent a l'equació lineal $y = ax + b$ on la pendent d'aquesta equació és la representació de la variació dels canvis de volum respecte el volum inicial i respecte el temps. Aquest valor també s'anomena **J_w** i es representa en cm^3/segon .

$$V_0 \left(\frac{dV/V_0}{dt} \right) = J_w$$

Finalment es calcula la permeabilitat osmòtica de l'aigua **Pf** en (cm/segon) per cada oòcit del grup experimental, mitjançant la següent fórmula:

$$Pf = \frac{J_w}{S_0 \times V_w \times (Osm_{in} - Osm_{out})}$$

on **J_w** és la variació del volum respecte el temps obtinguda anteriorment (cm^3/segon), **S₀** és l'àrea de l'oòcit en el moment inicial (cm^2), **V_w** és el volum molar de l'aigua ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$), **Osm_{in}** és la osmolaritat del medi Barth isoosmòtic (expressada en mols/cm^3) i **Osm_{out}** és la osmolaritat del medi Barth hipoosmòtic (expressada en mols/cm^3).

S'ha de tenir en compte que habitualment el valor de **Pf** es representa amb les unitats de $\mu\text{m}/\text{segon}$.

5. ANNEX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL.

AMPICIL·LINA.

Es dissol l'ampicil·lina en aigua Milli-Q a 100 mg/ml, es filtra a 0,22 µm i es guarda aliquotada a -20°C. Una vegada descongelada, es manté en gel. S'ha de tenir en compte que l'ampicil·lina s'inactiva a temperatures superiors a 55°C. Es treballa a 100 µg/ml.

KANAMICINA.

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

CLORAMFENICOL.

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

ESTREPTOMICINA.

Es dissol en aigua Milli-Q a 30 mg/ml i s'aliquota a -20°C. Es treballa a 30 µg/ml.

MEDI LB, LB-AGAR.

Es dissol en aigua Milli-Q, 1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl. En el cas de preparar LB-Agar, s'afegeix l'agar (1,5% en pes) a l'ampolla que conté LB. S'autoclava, es deixa refredar fins a 50°C i s'hi afegeix l'antibiòtic (si és necessari). S'aboca a les plaques de Petri i es deixa solidificar a temperatura ambient. Les plaques es guarden a 4°C en posició invertida.

MEDI SOC.

Es dissolen 20 g triptona, 5 g extracte de llevat, 0,5 g NaCl, 2,5 ml KCl 1M, 20 ml glucosa 1 M en 1 l d'aigua Milli-Q i s'autoclava.

TAE 50X.

Es pesen 242 g de Tris Base, i s'afegeixen 57,1 ml d'àcid acètic i 100 ml de EDTA 0,5 M. S'ajusta amb aigua fins a un litre.

PBS 10X.

Es dissol en aigua Milli-Q, 1,36 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄ i s'ajusta el pH a 7,4 amb HCl. Si el PBS 1X és per cultius, s'autoclava.

PARAFORMALDEHID (PFA) 4% EN PBS.

Cal manipular el PFA sempre sota la campana perquè és molt tòxic. Per 500 ml, es pesen 20 g de paraformaldehid en un vas de precipitats de vidre. En un altre vas s'escalfa 450 ml d'aigua Milli-Q fins que arriba a 60°C. Es va abocant l'aigua calenta al vas amb el PFA i es barreja amb un agitador. Quan està dissolt es tiren 2-3 gotes de NaOH 1 N fins que la solució quedi transparent. Es deixa refredar i s'afegeixen 50 ml de PBS 10X. Es fan alíquotes i es congelen a -20°C.

TAMPÓ DE CÀRREGA DE PROTEÏNES LSB 4X.

En un volum de 40 ml, es preparen 8 ml de Tris HCl 2 M a pH 6,8, 32 ml de glicerol, 3,2 g de SDS i 160 µl de blau de bromofenol. Si és necessari es poden afegir agents reductors: 1-10% β-Mercaptoetanol o 100mM DTT.

TAMPÓ D'ELECTROFORESI 10X.

(Tris base 250 mM, glicina 1,91 M, SDS 1%). Per un litre es pesen: 30,3 g de Tris, 144 g de glicina i 10 g de SDS. S'ajusta el pH a 8,3.

TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA 10X.

(Tris base 250 mM, glicina 1,92 mM). Per un litre es pesen: 30,3 g de Tris i 144 g de glicina. S'ajusta a pH 8,3. Tampó de transferència 1X: 100 ml de tampó de transferència 10X, 200 ml de metanol i 700 ml d'aigua. Es pot reciclar un parell de vegades guardant-lo a 4°C.

TTBS 10X.

Es dissol en aigua Milli-Q, 1,5 M NaCl, 100 mM Tris HCl, i s'ajusta a un pH de 7,4. Posteriorment se li afegeix 1% de Tween-20 o Tritó X-100 i s'agita suaument fins que el detergent queda ben dissolt.

ECL.

Es preparen 2 solucions *stock*: una de 90 mM d'àcid coumàric i una altra de 250 mM de luminol, ambdues amb DMSO, protegides de la llum, i guardades a -20°C.

Solució A: 5 ml Tris 1 M pH 8,5, 45 ml aigua, 110 µl àcid coumàric 90 mM, 250 µl luminol 250 mM.

Solució B: 100 µl H₂O₂ al 30% i 900 µl d'aigua.

Les dues solucions es conserven a 4°C protegides de la llum.

El reactiu ECL pel revelat es fa amb una relació 1 ml solució A + 15 µl solució B.

TRIS 1M.

Es pesen 60,5 g de 2-Amino-2(hydroxymethyl)-1-3propanediol (Tris) en 500 ml d'aigua Milli-Q. S'ajusta al pH desitjat i es filtra.

EDTA 0,5M.

Es dissol 90,3 g d'àcid etilen-diamino-tetra-acètic (EDTA) en aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8 amb NaOH (la solució passa de tèrbola a transparent).

HEPES 1M.

Es pesen 119 g de 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) en 500 ml d'aigua Milli-Q. S'ajusta el pH a 7,4 i es filtra.

AIGUA TRACTADA AMB DEPC.

Es dissol diethyl pyrocarbonat (DEPC) al 0,01% en aigua Milli-Q sota una campana extractora. Es deixa durant 16 hores a 37°C amb agitació i s'autoclava amb l'objectiu d'inactivar el DEPC.

6. ANNEX: CONSTRUCCIONS GENERADES PER BIOLOGIA**MOLECULAR.**

S'inclouen totes les construccions generades i utilitzades tant en els projectes inclosos en els objectius de la tesi com els inclosos en altres projectes.

<p>ENTRY CLONES PER INSERCIÓ D'EPÍTOPS</p> <p>1 3xFlag B1B5r 2 3xFlag B5B2 3 3xHA B1B5r 4 3xHA B5B2</p>	<p>ENTRY CLONES PROTEÏNES CANDIDATES</p> <p>42 TTYH1 B1B2 43 TTYH1 B1B5r 44 TTYH1 B5B2 45 OGC B1B2 46 OGC B1B5r 47 OGC B5B2 48 TRPC4 B1B2 49 TRPC4 B1B5r 50 TRPC4 B5B2 51 NBC B1B2 52 NBC B1B5r 53 NBC B5B2 54 GLT1 B1B2 55 GLT1 B1B5r 56 GLT1 B5B2 57 GlialCAM B1B2 58 GlialCAM-3xFlag B1B2 59 GlialCAM-3xHA B1B2</p>
<p>ENTRY CLONES PER FRET</p> <p>5 link YPET B5B2</p>	<p>ENTRY CLONES MUTANTS GLIALCAM</p> <p>60 GlialCAM R92Q B1B5r 61 GlialCAM R98C B1B5r 62 GlialCAM S196Y B1B5r 63 GlialCAM P148S B1B5r 64 GlialCAM R92W B1B5r 65 GlialCAM G89D B1B5r 66 GlialCAM G89S B1B5r 67 GlialCAM D128N B1B5r</p>
<p>ENTRY CLONES GRASP</p> <p>6 CD4spGFP1-10 B1B2 7 CD4spGFP11 B1B2</p>	<p>ENTRY CLONES QUIMERES GLIALCAM</p> <p>68 HepaCAM2 B1B2 69 HepaCAM2 B1B5r 70 (Q1) Hepa2 Ext TM Glial Int B1B5r 71 (Q2) Hepa2 Ext Glial TM Hepa2 Int B1B5r 72 (Q3) Glial Ext Hepa2 TM Int B1B5r 73 (Q4) Hepa2 Ext Glial TM Int B1B5r 74 (Q5) Glial Ext Hepa2 TM Glial Int B1B5r 75 (Q6) Glial Ext TM Hepa2 Int B1B5r 76 (Q7) Glial Ext TAC TM Int B1B5r 77 (Q8) TAC Glial Int B1B5r 78 (Q9) Glial Ext TAC TM Int Glial Int B1B5r 79 (Q10) TAC Ext Glial TM TAC Int B1B5r 80 (Q11) TAC Ext Glial BefTM TAC Int B1B5r 81 GlialCAM Ext TAC TM Int B1B5r 82 GlialCAM Int B5B2 83 TAC Ext Glial TM TAC Int B1B5r 84 TAC Ext Glial BefTM TAC Int B1B5r 85 GlialCAM Int link TEV-C B5B2 86 GlialCAM Int-3xFlag B5B2 87 CD4 B1B5r 88 CD4cc B1B5r 89 CD8 B1B5r</p>
<p>ENTRY CLONES MÈTODE SPLIT-TEV</p> <p>8 TEV link B1B5r 9 link TEV B5B2 10 TEV-N link B1B5r 11 link TEV-N B5B2 12 TEV-C link B1B5r 13 link TEV-C B5B2 14 TEV-Cmut link B1B5r 15 link TEV-Cmut B5B2 16 link TEV-N TEVS1 GV B5B2 17 link TEV-N TEVS3 GV B5B2 18 GV TEVS1 B1B5r 19 TEVS1 GV B5B2 20 GV TEVS1 TEV-N link B1B5r 21 GV TEVS2 B1B5r 22 TEVS2 GV B5B2 23 GV TEVS3 B1B5r 24 GV TEVS3 TEV-N link B1B5r 25 TAC B1B5r 26 TfR B5B2 27 4F2hc B5B2</p>	<p>ENTRY CLONES PROTEÏNES CONTROL MÈTODES D'INTERACCIÓ</p> <p>28 A2ARflag B1B5r 29 D2R B1B5r 30 GabaBR1myc B1B5r 31 GabaBR2 B1B5r 32 FKBP B1B5r 33 FRB B1B5r 34 E47 B1B5r 35 MASH B1B5r 36 MASH ΔHLH B1B5r</p>
<p>ENTRY CLONES RELACIONATS AMB MLC1</p> <p>37 HA-MLC1-Haloop B1B2 38 HA-MLC1-Haloop I95M B1B2 39 HA-MLC1-Haloop V64R B1B2 40 long mMLC1 B1B2 41 Nt MLC1 B1B5r</p>	

<p>ENTRY CLONES DELECCIONS GLIALCAM</p> <p>90 GlialCAM ΔIgV B1B5r 91 GlialCAM ΔIgC2 B1B5r 92 GlialCAM ΔC Ser 331 B1B5r 93 GlialCAM ΔC Ala398 B1B5r</p>	<p>EXPRESSION CLONES PROTEINES CONTROL MÈTODES D'INTERACCIÓ</p> <p>132 A2ARflag link TEV pcDNA3 133 A2ARflag link TEV-N pcDNA3 134 A2ARflag link TEV-C pcDNA3 135 A2ARflag link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 136 A2ARflag link TEV-N TEVS3 GV pcDNA3 137 A2ARflag link TEV-C pcDNA6.2 TK 138 D2R link TEV pcDNA3 139 D2R link TEV-N pcDNA3 140 D2R link TEV-C pcDNA3 141 D2R link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 142 D2R link TEV-C pcDNA6.2 TK 143 GabaBR1myc link TEV pcDNA3 144 GabaBR1myc link TEV-N pcDNA3 145 GabaBR1myc link TEV-C pcDNA3 146 GabaBR1myc link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 147 GabaBR1myc link TEV-C pcDNA6.2 TK 148 GabaBR2 link TEV pcDNA3 149 GabaBR2 link TEV-N pcDNA3 150 GabaBR2 link TEV-C pcDNA3 151 GabaBR2 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 152 GabaBR2 link TEV-C pcDNA6.2 TK 153 zipper link TEV pcDNA3 154 zipper link TEV-N pcDNA3 155 zipper link TEV-C pcDNA3 156 zipper link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 157 zipper link TEV-C pcDNA6.2 TK 158 FKBP link TEV pcDNA3 159 FKBP link TEV-N pcDNA3 160 FKBP link TEV-C pcDNA3 161 FRB link TEV pcDNA3 162 FRB link TEV-N pcDNA3 163 FRB link TEV-C pcDNA3 164 E47 link TEV pcDNA3 165 E47 link TEV-N pcDNA3 166 E47 link TEV-C pcDNA3 167 E47 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3 168 MASH link TEV-C pcDNA3 169 MASH link TEV-C pcDNA6.2 TK 170 MASH ΔH LH link TEV-C pcDNA3 171 MASH ΔH LH link TEV-C pcDNA6.2 TK 172 TEV-C link LAT-2 pcDNA3 173 GV TEVS1 TEV-N link LAT-2 pcDNA3 174 TEV-C link LAT-2 pcDNA6.2 TK</p>
<p>ENTRY CLONES MUTANTS TM ALA</p> <p>94 GlialCAM TM Ala 123 B1B5r 95 GlialCAM TM Ala 456 B1B5r 96 GlialCAM TM Ala 789 B1B5r 97 GlialCAM TM Ala 101112 B1B5r 98 GlialCAM TM Ala 131415 B1B5r 99 GlialCAM TM Ala 161718 B1B5r 100 GlialCAM TM Ala 192021 B1B5r 101 GlialCAM TM Ala 222324 B1B5r</p>	
<p>ENTRY CLONES RELACIONATS AMB CLCs</p> <p>102 CIC-2 HA B1B5r 103 CIC-2 V354P B1B2 104 CIC-2 V354P B1B5r 105 CIC-2 Δ(2,3)Δ(16-61) B1B5r 106 Dm CIC-2 B1B5r</p>	
<p>VECTOR DESTÍ</p> <p>107 pcDNA6.2 TK DEST</p>	
<p>PROTEINES DE FUSIÓ</p> <p>108 Glial Ext pEF 109 CD147 mouse Fc ED 110 Glial Ext human Fc pINFUSE 111 Glial Ext mouse Fc pINFUSE 112 CD137 pcDNA6 V5 His 113 Glial Ext pcDNA6 V5 His</p>	
<p>EXPRESSION CLONES GRASP</p> <p>114 CD4spGFP1-10 pcDNA3 115 CD4spGFP11 pcDNA3</p>	
<p>EXPRESSION CLONES MÈTODE SPLIT-TEV</p> <p>116 TAC TEVS1 GV pcDNA3 117 TAC TEVS2 GV pcDNA3 118 TAC link TEV-C pcDNA6.2 TK 119 GV TEVS1 TfR pcDNA3 120 GV TEVS2 TfR pcDNA3 121 GV TEVS3 TfR pcDNA3 122 TEV-N link TfR pcDNA3 123 TEV-C link TfR pcDNA6.2 TK 124 GV TEVS1 4F2hc pcDNA3 125 GV TEVS2 4F2hc pcDNA3 126 TEV-N link 4F2hc pcDNA3 127 GV TEVS1 TEV-N link 4F2hc pcDNA3 128 TEV-C link 4F2hc pcDNA6.2 TK 129 3xFlag 4F2hc pcDNA3 130 GV TEVS2-3xFlag pcDNA3 131 Gluc pcDNA6.2 TK</p>	

EXPRESSION CLONES PROTEÏNES CANDIDATES

175 TTYH1-3xFlag pcDNA3
 176 3xFlag-TTYH1 pcDNA3
 177 TTYH1-3xHA pcDNA3
 178 3xHA-TTYH1 pcDNA3
 179 TTYH1 pCS
 180 TRPC4-3xFlag pcDNA3
 181 3xFlag-TRPC4 pcDNA3
 182 TRPC4-3xHA pcDNA3
 183 3xHA-TRPC4 pcDNA3
 184 NBC-3xFlag pcDNA3
 185 3xFlag-NBC pcDNA3
 186 NBC-3xHA pcDNA3
 187 3xHA-NBC pcDNA3
 188 NBC link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 189 NBC link TEV-C pcDNA6.2 TK
 190 GLT1-3xFlag pcDNA3
 191 3xFlag-GLT1 pcDNA3
 192 GLT1-3xHA pcDNA3
 193 3xHA-GLT1 pcDNA3
 194 GLT1 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 195 GLT1 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 196 ZO1 link TEV-C pcDNA3
 197 TEV-C link ZO1 pcDNA3
 198 ZO1 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 199 TEV-C link ZO1 pcDNA6.2 TK

EXPRESSION CLONES RELACIONATS AMB MLC1

200 MLC1 pcDNA3
 201 MLC1 pCS
 202 HA MLC1 HA pCS
 203 HA-MLC1-Haloop I95M pCS
 204 HA-MLC1-Haloop V64R pCS
 205 long mMLC1 pcDNA3
 206 MLC1 link TEV pcDNA3
 207 TEV link MLC1 pcDNA3
 208 MLC1 link TEV-N pcDNA3
 209 TEV-N link MLC1 pcDNA3
 210 MLC1 link TEV-C pcDNA3
 211 TEV-C link MLC1 pcDNA3
 212 MLC1 link TEV-Cmut pcDNA3
 213 MLC1 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 214 GV TEVS1 TEV-N link MLC1 pcDNA3
 215 MLC1 link TEV-N TEVS3 GV pcDNA3
 216 MLC1 link TEV pcDNA6.2 TK
 217 MLC1 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 218 TEV-C link MLC1 pcDNA6.2 TK
 219 Nt MLC1 TfR pcDNA3
 220 TAC Ct MLC1 pcDNA3

EXPRESSION CLONES RELACIONATS AMB GLIALCAM

221 GlialCAM pcDNA3
 222 GlialCAM pCS
 223 GlialCAM-3xFlag pcDNA3
 224 GlialCAM-3xHA pcDNA3
 225 GlialCAM-3Flag pCS
 226 GlialCAM-3xHA pCS
 227 GlialCAM link TEV pcDNA3
 228 GlialCAM link TEV-N pcDNA3
 229 GlialCAM link TEV-C pcDNA3
 230 GlialCAM link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 231 GlialCAM link TEV-N TEVS3 GV pcDNA3
 232 GlialCAM link TEV-C pcDNA3
 233 GlialCAM link TEV-C pcDNA6.2 TK

EXPRESSION CLONES MUTANTS DE GLIALCAM

234 GlialCAM R92Q-3xFlag pcDNA3
 235 GlialCAM R98C-3xFlag pcDNA3
 236 GlialCAM S196Y-3xFlag pcDNA3
 237 GlialCAM P148S-3xFlag pcDNA3
 238 GlialCAM R92W-3xFlag pcDNA3
 239 GlialCAM G89D-3xFlag pcDNA3
 240 GlialCAM G89S-3xFlag pcDNA3
 241 GlialCAM D128N-3xFlag pcDNA3
 242 GlialCAM R92Q-3xFlag pCS
 243 GlialCAM R98C-3xFlag pCS
 244 GlialCAM G89D-3xFlag pCS
 245 GlialCAM R92W-3xFlag pCS
 246 GlialCAM R98C link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 247 GlialCAM R92W link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 248 GlialCAM D128N link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 249 GlialCAM R92Q link TEV-C pcDNA6.2 TK
 250 GlialCAM R98C link TEV-C pcDNA6.2 TK
 251 GlialCAM S196Y link TEV-C pcDNA6.2 TK
 252 GlialCAM P148S link TEV-C pcDNA6.2 TK
 253 GlialCAM R92W link TEV-C pcDNA6.2 TK
 254 GlialCAM G89D link TEV-C pcDNA6.2 TK
 255 GlialCAM G89S link TEV-C pcDNA6.2 TK
 256 GlialCAM D128N link TEV-C pcDNA6.2 TK

EXPRESSION CLONES MUTANTS TM ALA

333 GlialCAM TM Ala 789-3xFlag pcDNA3
 334 GlialCAM TM Ala 123-3xFlag pCS
 335 GlialCAM TM Ala 456-3xFlag pCS
 336 GlialCAM TM Ala 789-3xFlag pCS
 337 GlialCAM TM Ala 101112-3xFlag pCS
 338 GlialCAM TM Ala 131415-3xFlag pCS
 339 GlialCAM TM Ala 161718-3xFlag pCS
 340 GlialCAM TM Ala 192021-3xFlag pCS
 341 GlialCAM TM Ala 222324-3xFlag pCS

EXPRESSION CLONES QUIMERES GLIALCAM

257 HepaCAM2-3Flag pcDNA3
 258 HepaCAM2 pCS
 259 HepaCAM2-3Flag pCS
 260 HepaCAM2 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 261 HepaCAM2 link TEV-C pcDNA3
 262 HepaCAM2 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 263 TAC-3xFlag pcDNA3
 264 TAC-3xFlag pCS
 265 (Q1) -3xFlag pcDNA3
 266 (Q2) -3xFlag pcDNA3
 267 (Q3) -3xFlag pcDNA3
 268 (Q4) -3xFlag pcDNA3
 269 (Q5) -3xFlag pcDNA3
 270 (Q6) -3xFlag pcDNA3
 271 (Q7) -3xFlag pcDNA3
 272 (Q8) -3xFlag pcDNA3
 273 (Q9) -3xFlag pcDNA3
 274 (Q10) -3xFlag pcDNA3
 275 (Q11) -3xFlag pcDNA3
 276 (Q12) -3xFlag pcDNA3
 277 (Q1) -3xFlag pCS
 278 (Q2) -3xFlag pCS
 279 (Q3) -3xFlag pCS
 280 (Q4) -3xFlag pCS
 281 (Q5) -3xFlag pCS
 282 (Q6) -3xFlag pCS
 283 (Q7) -3xFlag pCS
 284 (Q8) -3xFlag pCS
 285 (Q9) -3xFlag pCS
 286 (Q10) -3xFlag pCS
 287 (Q11) -3xFlag pCS
 288 (Q12) -3xFlag pCS
 289 (Q1) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 290 (Q2) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 291 (Q3) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 292 (Q4) link TEV-C pcDNA3
 293 (Q4) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 294 (Q5) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 295 (Q6) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 296 (Q7) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 297 (Q8) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 298 (Q9) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 299 (Q10) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 300 (Q11) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 301 (Q12) link TEV-C pcDNA6.2 TK
 302 (Q1) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 303 (Q2) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 304 (Q3) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 305 (Q4) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 306 (Q5) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 307 (Q6) link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3

EXPRESSION CLONES CD4 QUIMERES

308 CD4-3xFlag pcDNA3
 309 CD4cc-3xFlag pcDNA3
 310 CD4 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 311 CD4cc link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 312 CD4 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 313 CD4cc link TEV-C pcDNA6.2 TK
 314 CD4 Glial Int pcDNA3
 315 CD4cc Glial Int pcDNA3
 316 CD4 Glial Int link TEV-C pcDNA6.2 TK
 317 CD4cc Glial Int link TEV-C pcDNA6.2 TK
 318 CD8 Glial Int pcDNA3

EXPRESSION CLONES DELECIONS GLIALCAM

319 GlialCAM ΔExt-3xFlag pcDNA3
 320 GlialCAM ΔIgV-3xFlag pcDNA3
 321 GlialCAM ΔIgC2-3xFlag pcDNA3
 322 GlialCAM ΔC-3xFlag pcDNA3
 323 GlialCAM ΔC Ser 331-3xFlag pcDNA3
 324 GlialCAM ΔC Ala398-3xFlag pcDNA3
 325 GlialCAM ΔIgV-3xFlag pCS
 326 GlialCAM ΔIgC2-3xFlag pCS
 327 GlialCAM ΔC-3xFlag pCS
 328 GlialCAM ΔC Ser 331-3xFlag pCS
 329 GlialCAM ΔC Ala398-3xFlag pCS
 330 GlialCAM ΔC link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 331 GlialCAM ΔIgV link TEV-C pcDNA6.2 TK
 332 GlialCAM ΔIgC2 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 333 GlialCAM ΔC link TEV-C pcDNA6.2 TK
 334 GlialCAMΔCSer331 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 335 GlialCAMΔCAla398 link TEV-C pcDNA6.2 TK

EXPRESSION CLONES RELACIONATS AMB CLCs

336 HA CIC-2 pcDNA3
 337 3xFlag CIC-2 pcDNA3
 338 CIC-2 HA-3xHA pcDNA3
 339 CIC-2 HA-3xHA pADV
 340 CIC-2 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 341 GV TEVS1 TEV-N link CIC-2 pcDNA3
 342 CIC-2 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 343 TEV-C link CIC-2 pcDNA6.2 TK
 344 CIC-2 V354P pcDNA3
 345 CIC-2 V354P-3xFlag pcDNA3
 346 CIC-2 V354P link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 347 CIC-2 V354P link TEV-C pcDNA6.2 TK
 348 CIC-2 Δ6-3xFlag pCS
 349 CIC-2 Δ6 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 350 CIC-2 Δ6 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 351 Dm CIC-2-3xFlag pCS
 352 Dm CIC-2 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 353 Dm CIC-2 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 354 CIC-1 link TEV-N TEVS1 GV pcDNA3
 355 GV TEVS1 TEV-N link CIC-1 pcDNA3
 356 CIC-1 link TEV-C pcDNA6.2 TK
 357 HA CIC-1 R300A pTLN
 358 Barttin TEV-N TEVS1 GV pcDNA3

(*) Part de les construccions per la inserció d'epítops i dels mutants de GlialCAM han sigut realitzades per la Dra. Tania López-Hernández.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1

**Desenvolupament del mètode Split-TEV
per validar interaccions entre proteïnes
de membrana.**

1. INTRODUCCIÓ.

Les interaccions proteïna-proteïna (PPIs) són essencials per gairebé tots els processos cel·lulars (Petschnigg et al., 2011b). Les interaccions entre proteïnes de membrana són especialment importants ja que una tercera part del proteoma està format per proteïnes de membrana (Petschnigg et al., 2011a). L'estudi de les interaccions entre proteïnes de membrana és tècnicament difícil degut a que són proteïnes hidrofòbiques, fet que provoca que tinguin el moviment restringit a dues dimensions degut a l'ancoratge a la membrana cel·lular. Habitualment presenten uns nivells baixos d'expressió que provoquen dificultats en l'anàlisi. Tècniques d'interacció com la coimmunoprecipitació requereixen de la solubilització de la membrana cel·lular, i això pot trencar interaccions i/o crear-ne d'inespecífiques, generant problemes a l'hora de definir les interaccions entre proteïnes de membrana. Per tot això, les interaccions proteïna-proteïna s'han d'interpretar amb molta cura, utilitzant gran quantitat de controls en els mètodes d'estudi i si és possible, demostrar-les per més d'un mètode.

Els mètodes basats en la complementació de fragments de proteïna (PCA) han esdevingut protagonistes en l'estudi d'interaccions de proteïnes de membrana en els últims anys (Snider et al., 2010a, 2010b). En aquest tipus de mètodes, dues proteïnes d'interès són fusionades a fragments complementaris d'una proteïna reportera. Si les proteïnes interaccionen, els fragments es troben i es pleguen segons l'estructura nativa reconstituint l'activitat de la proteïna reportera (Remy and Michnick, 2007).

Recentment, s'ha descrit el mètode Split-TEV com a un tipus nou de PCA desenvolupat en cèl·lules de mamífer i basat en la reconstitució funcional de la proteasa del virus del tabac (*tobacco etch virus*, TEV), que mitjançant l'activitat proteolítica, activa una sèrie de gens reporters (Djannatian et al., 2011; Wehr et al., 2006, 2008). Aquest mètode combina els avantatges dels mètodes de complementació de proteïnes amb els dels assajos mitjançats per gens reporters. Això es tradueix en una fàcil implementació del mètode i una gran amplificació de la senyal que s'obté, tot i que aquesta gran sensibilitat pot ser responsable de falsos positius d'interacció.

Tot i que s'ha descrit el mètode Split-TEV per identificar interaccions entre proteïnes tant citosòliques com de membrana (Wehr et al., 2006), en aquesta Tesi ens hem centrat en l'estudi de les proteïnes de membrana, ja que les proteïnes implicades en MLC, MLC1 i GlialCAM són proteïnes de membrana. Existeixen dues variants diferents per desenvolupar el mètode Split-TEV per proteïnes de membrana. En la primera

variant (**Figura 37 A**), cada proteïna d'estudi té fusionat un fragment de la proteasa TEV (TEV-N o TEV-C). Per altra banda, s'incorpora una proteïna de membrana qualsevol anomenada *carrier*, que no presenta interacció amb cap de les dues anteriors. Aquesta proteïna *carrier* té fusionat el substrat de reconeixement de la TEV (TEVs) i un factor de transcripció (FT). En la segona variant (**Figura 37 B**), una proteïna d'estudi té fusionats un fragment de la proteasa TEV (TEV-N), el substrat de reconeixement (TEVs) i el factor de transcripció (TF). L'altra proteïna d'interès té fusionat l'altre fragment de la proteasa TEV (TEV-C). En les dues situacions, si es produeix interacció entre les proteïnes estudiades, l'enzim reconstitueix la seva activitat, proteolitza el substrat i s'allibera el factor de transcripció que pot arribar al nucli de la cèl·lula i activar la transcripció del gen reporter que generarà una activitat fàcilment detectable.

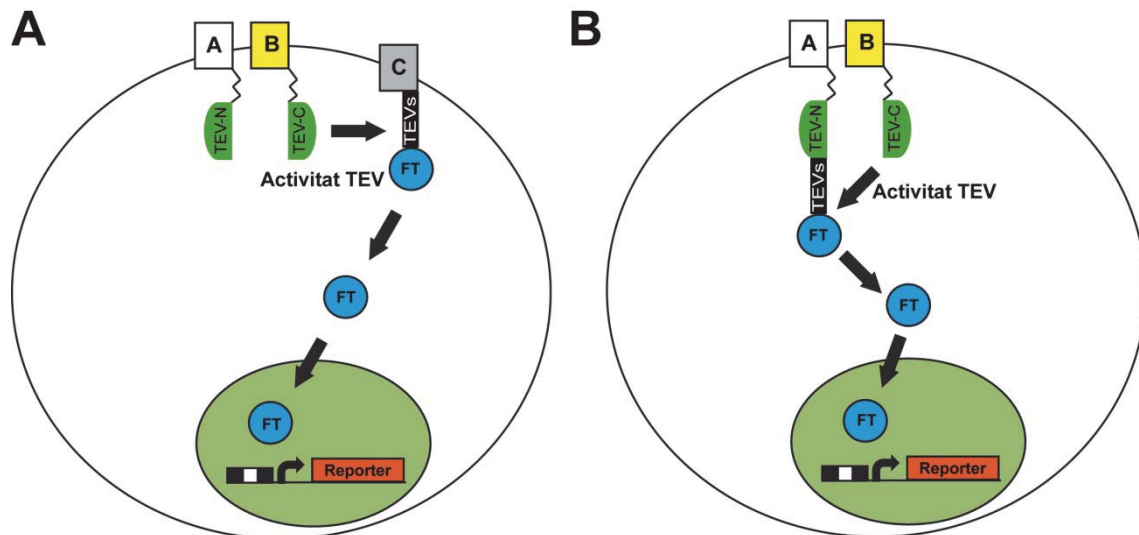


Figura 37. Esquema de les possibles variants del mètode Split-TEV per proteïnes de membrana. A. Cadascuna de les proteïnes d'interès (A, en blanc i B, en groc) tenen fusionat un fragment de la proteasa TEV (TEV-N o TEV-C). En interaccionar, l'enzim TEV reconstitueix l'activitat proteasa i talla el seu substrat (TEVs) que està a la membrana ja que es troba fusionat a una proteïna *carrier* (C, en gris), alliberant un factor de transcripció (FT) que activa a un gen reporter. **B.** La proteïna d'estudi A (en blanc) té fusionats el fragment TEV-N, el substrat (TEVs) i el factor de transcripció (FT), i la proteïna d'estudi B (en groc) té fusionat el fragment TEV-C. En produir-se la reconstitució de l'activitat, el factor de transcripció és alliberat i la transcripció del gen reporter s'activa.

2. IMPLEMENTACIÓ DEL MÈTODE SPLIT-TEV EN EL LABORATORI.

Per implementar aquest mètode en el laboratori, es va escollir com a factor de transcripció el GAL4-VP16 (vector pBT3-N; P03230) (GV), que conté el domini d'unió al DNA del promotor GAL4 de llevat i el domini de transactivació VP16 del virus *Herpes simplex*.

Per altra banda, es volia un gen reporter que aportés una clara visualització de la senyal, facilitant el desenvolupament de la tècnica. Es va escollir treballar amb el plàsmid *pNEBR-X1 Gluc* (New England Biolabs) que conté el cDNA d'una *Gaussia Luciferase* (Gluc) de secreció, juntament amb la seqüència UAS (*Upstream Activation Sequence*) que presenta 5 elements específics de resposta al promotor GAL4 de llevat i activa la transcripció del gen. L'activació d'aquest gen per part del factor de transcripció GV, produeix una proteïna Gluc que és secretada al medi extracel·lular i en posar-se en contacte amb colenterazina nativa, que és el substrat de la Gluc, genera llum que es pot detectar amb un luminòmetre (**Figura 38**).

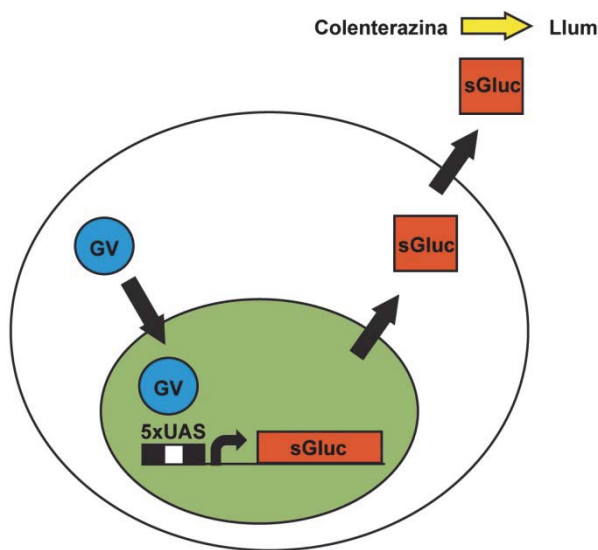


Figura 38. Esquema del funcionament del mètode de detecció de la senyal. En entrar al nucli, el factor de transcripció (GV) que conté el domini d'unió al DNA de GAL4, reconeix les seqüències UAS i provoca l'activació de la transcripció del gen de la *Gaussia luciferase* de secreció (sGluc). Aquesta *Gaussia luciferase* és secretada fins al medi extracel·lular. Si es posa en contacte el medi extracel·lular amb colenterazina nativa, aquesta actua com a substrat de la Gluc i es genera llum que es pot mesurar amb un luminòmetre.

La proteasa TEV que es va escollir per treballar va ser la variant TEV S219V, un mutant de l'enzim que evita la inhibició per autoproteòlisi ja que el domini catalític de la TEV té tendència a tallar-se *in vitro* entre els residus 218 i 219. A més a més, aquesta variant té una K_M de 0,041, que és menor que la K_M de la variant *wild type* ($K_{MTEV}=0,061$) i per tant, presenta un augment de l'afinitat pel seu substrat (Van den Berg et al., 2006; Kapust et al., 2001; Phan et al., 2002). La proteasa TEV va ser fraccionada en dos parts: la part N-terminal (TEV-N) que engloba els aminoàcids 1-118 i la part C-terminal (TEV-C) que engloba els aminoàcids 119-242. La complementació d'aquests fragments provoca una activitat catalítica del 40% de l'activitat de la TEV sencera, que és el percentatge d'activitat més alt que s'ha trobat entre totes les fragmentacions de la TEV (Wehr et al., 2006). Aquests dos fragments van ser fusionats a les proteïnes d'estudi mitjançant un adaptador o *linker*, que és una seqüència de glicines i serines que permet una major mobilitat als fragments a l'hora de reconstituir-se.

Referent al substrat de reconeixement de la TEV, es va escollir treballar amb un substrat d'alta afinitat per l'enzim (TEVs) la seqüència del qual és ENLYFQS i que presenta una relació K_{cat}/K_M alta ($4,51 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) amb la variant TEV S219V en comparació amb altres substrats (Kapust et al., 2002; Phan et al., 2002; Tözsér et al., 2005).

Per posar a punt i reproduir el mètode Split-TEV per proteïnes de membrana i així obtenir-ne un coneixement òptim, es van utilitzar proteïnes control. Com a interaccions positives ja validades es va considerar l'homodimerització de MLC1 (Teijido et al., 2004) i l'homodimerització del receptor d'adenosina A_2AR (Canals et al., 2004), un receptor acoblat a proteïnes G, que igual que MLC1, presenta varis dominis transmembrana. Com a interaccions negatives o senyal inespecífic del mètode es va escollir la interacció entre MLC1 i el receptor d'adenosina A_2AR ja que no s'han relacionat de cap manera.

Totes les construccions de les proteïnes utilitzades es van realitzar mitjançant el sistema de clonatge *Gateway* (Invitrogen). Aquest clonatge va finalitzar amb la incorporació dels constructes al vector pcDNA3, que és un vector d'expressió en cèl·lules de mamífer sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

En totes les transfeccions efectuades, es va utilitzar el plàsmid pCMV- β Gal per poder monitoritzar l'eficiència de transfecció de cada condició experimental i així poder corregir els valors d'activitat luciferasa pels nivells de transfecció.

Amb totes aquestes especificacions, es va decidir començar a desenvolupar l'aplicació del mètode Split-TEV que utilitza una proteïna *carrier* (**Figura 37 A**).

3. DEFINICIÓ DE LA PROTEÏNA CARRIER.

El bon funcionament de la proteïna portadora o *carrier* és essencial per l'èxit del mètode, per això es va clonar el substrat de reconeixement de la TEV (TEVs) i el factor de transcripció (GV) a diferents proteïnes de membrana. Per evitar que la fusió del TEVs i el GV generés problemes de plegament o degradació, es van escollir quatre proteïnes d'un sol pas transmembrana ja que aquest tipus d'estructura facilita l'expressió i la localització a la membrana. Es va escollir l'antigen de superfície 4F2hc, el receptor del factor de creixement PDGF- α , el receptor d'interleuquina 2 (TAC) i el receptor de transferrina (TfR). La fusió del TEVs i el GV es va fer a l'extrem N-terminal

en el cas de 4F2hc i TfR i a l'extrem C-terminal en el cas de TAC i PDGF- α degut a que s'ha de fer la fusió a la part intracel·lular de cada proteïna.

Un cop generades les construccions, es va mesurar l'activitat luciferasa que generaven els constructes per si sols, o cotransfectats amb MLC1 fusionat a la TEV sencera (MLC1-TEV), com a control positiu de màxima activitat catalítica possible (**Figura 39**).

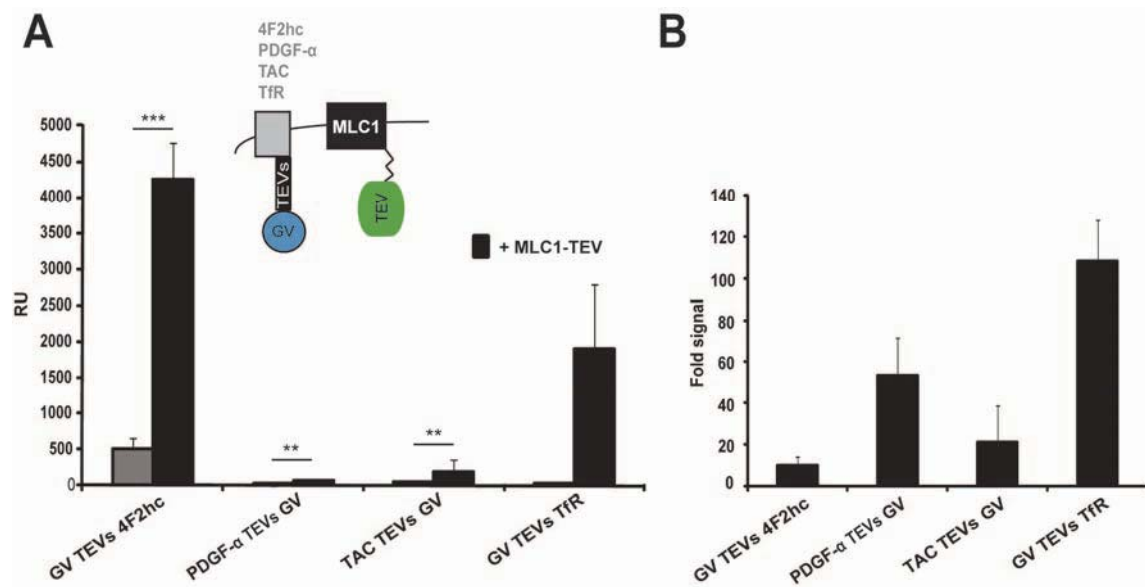


Figura 39. Prova de carriers. **A.** Activitat luciferasa corregida pels nivells de transfecció de les construccions de les proteïnes *carrier* soles (barres grises) o amb la presència de MLC1-TEV (barres negres). Esquema de les construccions transfectades a l'interior. **B.** Representació dels nivells d'inducció de senyal (fold signal) produït per l'activitat de la TEV respecte la senyal obtinguda per autoproteòlisi de la proteïna que conté el factor de transcripció (GV). Dades corresponents a 4 experiments independents. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecte la senyal d'autoproteòlisi de cada grup; t-student no aparellada.

En absència de l'enzim, es va observar que existia autoproteòlisi de les construccions amb les proteïnes *carrier* ja que s'observava activitat luciferasa (**Figura 39 A, barres grises**). Per altra banda, en presència de l'enzim TEV s'obtenien diferents senyals d'activitat luciferasa depenent de la proteïna *carrier* utilitzada. Per això es va decidir treballar amb la millor relació de senyal d'activitat produïda per l'enzim respecte a la senyal de fons (soroll) que es generava amb la transfecció de les proteïnes *carrier* soles (**Figura 39 B**). A partir d'aquest estudi es va decidir que les dades de luminescència, un cop corregides pels nivells de transfecció, es presentarien sempre com a senyal d'inducció (*fold signal*). Aquesta inducció és la resultant de dividir la senyal obtinguda en cada grup experimental, per la senyal obtinguda en transfectar únicament el constructe que té fusionat el factor de transcripció.

Aquests resultats van demostrar que la proteïna *carrier* estudiada més òptima era el receptor de transferrina (TfR), ja que s'observava una relació entre l'activitat de l'enzim

i l'autoproteòlisi superior a 100 vegades i per tant, proporcionava al mètode una senyal d'activitat prou alta per aplicar-lo amb l'enzim TEV fraccionat.

4. PROVA DEL MÈTODE.

Un cop establertes totes les condicions, es va realitzar el mètode Split-TEV intentant validar l'homodimerització de MLC1 i A₂AR i la no interacció entre aquestes dues proteïnes. Prèviament, es va comprovar que les construccions que contenien l'enzim fraccionat (TEV-N i TEV-C) no produïen senyal d'activitat luciferasa en ser transfectades soles (dades no mostrades). Un cop realitzat el mètode (**Figura 40**), es va observar que s'obtenien nivells d'inducció alts en el cas de les homodimeritzacions, però també existia una gran inducció de senyal produïda en el control negatiu d'interacció (interacció MLC1-A₂AR). Aquesta inespecificitat va provocar que no hi haguessin diferències significatives entre la senyal obtinguda en els controls positius i la senyal obtinguda en els controls negatius, i no es van poder validar les homodimeritzacions de MLC1 i A₂AR.

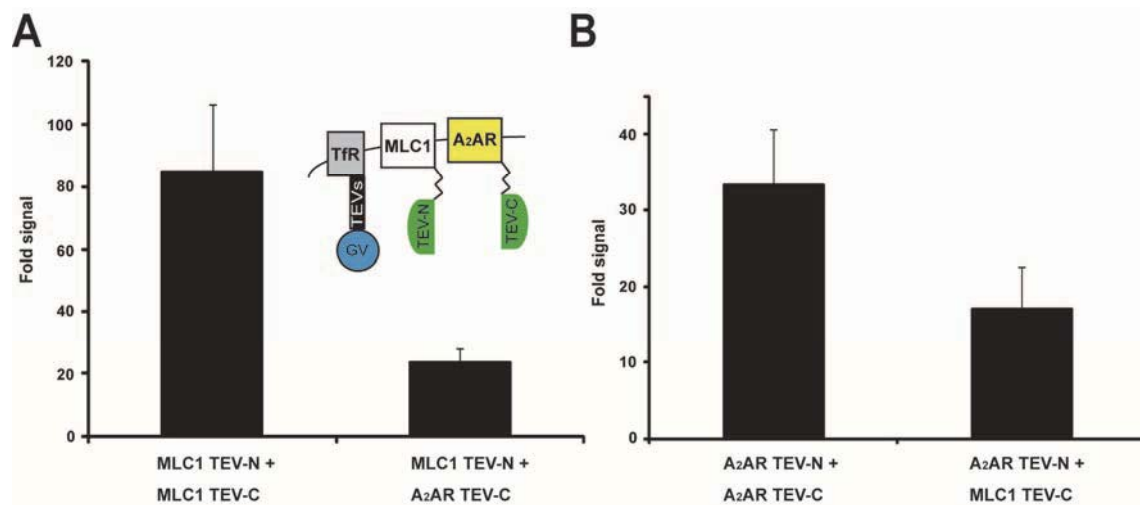


Figura 40. Implementació del mètode Split-TEV. **A.** Representació dels nivells d'inducció de senyal produïts per l'homodimerització de MLC1 i la interacció MLC1-A₂AR per Split-TEV, utilitzant les construccions indicades (es mostra una representació esquemàtica d'un tipus d'interacció a dins). **B.** Representació dels nivells d'inducció de senyal produïts per l'homodimerització de A₂AR i la interacció A₂AR-MLC1 per Split-TEV, utilitzant les construccions indicades. Dades corresponents a 5 experiments independents.

5. CANVIS EN L'AFINITAT ENZIM-SUBSTRAT.

Una possible raó de la inespecificitat en l'activitat podria ser que l'enzim reconstituït tingués molta facilitat per reconèixer el substrat i degut a l'amplificació de senyal provocada pel mètode, es generés activitat en totes les condicions experimentals. En aquest cas, si es provoqués algun impediment en el funcionament de l'enzim, es

podria arribar a observar únicament les interaccions específiques ja que habitualment són més fortes. Si es considera la reconstitució i l'activitat proteasa com a una reacció enzimàtica, hi ha dues opcions per obstaculitzar el sistema i baixar l'afinitat dels components: utilitzar un substrat de baixa afinitat per l'enzim o utilitzar un enzim que presenti impediments per reconèixer el substrat.

Per provar la primera condició, es va decidir utilitzar un substrat de baixa afinitat per l'enzim, la seqüència del qual és ENLYFQL i presenta una relació K_{cat}/K_M molt baixa ($0,06 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) amb la variant TEV S219V en comparació amb altres substrats (Kapust et al., 2002; Tözsér et al., 2005). Es va generar el constructe de la proteïna *carrier* que contenia el factor de transcripció (GV), el substrat de baixa afinitat per la TEV (TEVsLA) i el receptor de transferrina i es va fer l'assaig de luminescència (**Figura 41**).

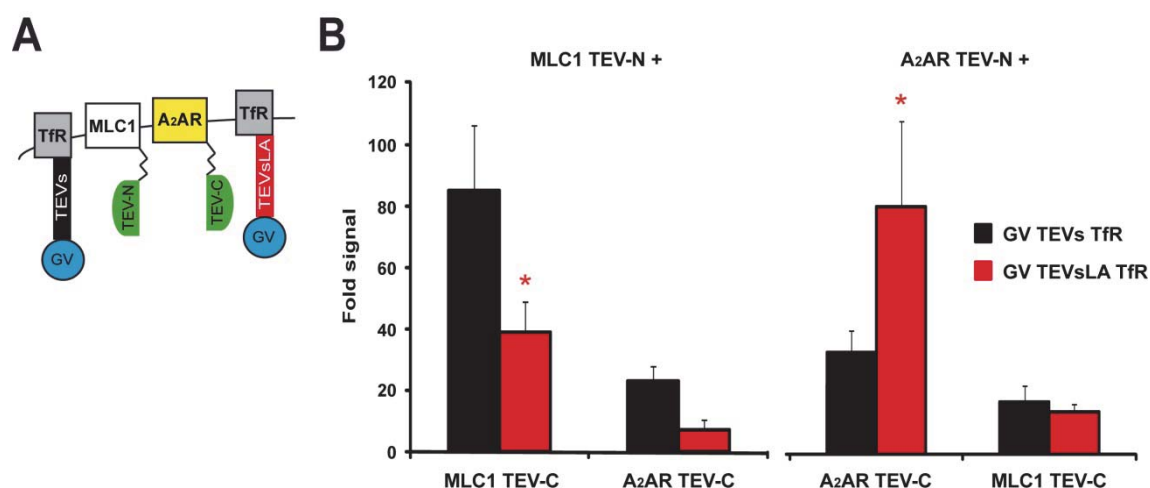


Figura 41. Comparativa entre els substrats d'alta i baixa afinitat. **A.** Representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental diferenciant els dos tipus de substrat. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de MLC1 o A₂AR i la no interacció entre aquestes dues proteïnes. Es diferencia la utilització d'un substrat d'alta afinitat per la TEV (TEVs, en negre) i un substrat de baixa afinitat per la TEV (TEVsLA, en vermell). Dades corresponents a 5 experiments independents. * p<0.05 respecte la senyal d'interacció negativa de cada grup experimental; t-student no aparellada.

Amb el substrat de baixa afinitat es va observar una caiguda en l'activitat luciferasa en el cas de la interacció de MLC1 però no va ser així en el cas de A₂AR. A les dues condicions estudiades però, es va veure una caiguda de l'activitat inespecífica del mètode i per tant s'intuïa una certa millora en l'especificitat ja que es va observar diferències estadístiques de la senyal d'interacció positiva respecte la senyal d'interacció negativa. Tot i així la inducció de senyal produïda pels controls negatius continuava tenint uns nivells massa alts per diferenciar clarament interacció i falsos positius.

La segona condició per baixar l'afinitat d'algun dels components de l'activitat proteasa de la TEV era utilitzar un enzim de baixa afinitat. Per això, es va generar un doble mutant de l'enzim TEV S219V amb què estàvem treballant. El doble mutant TEV V219S i F217K té completament accessible el lloc d'inhibició per autoproteòlisi i això provoca que la seva K_M sigui de 0,466 i que per tant, l'afinitat pel substrat disminueixi considerablement (Van den Berg et al., 2006; Kapust et al., 2001; Phan et al., 2002). Es van elaborar totes les construccions requerides per poder utilitzar la nova proteïna TEV de baixa afinitat (TEVLA) i es va dur a terme l'assaig de luminescència per validar l'homodimerització de MLC1, amb els substrats d'alta i baixa afinitat (**Figura 42**).

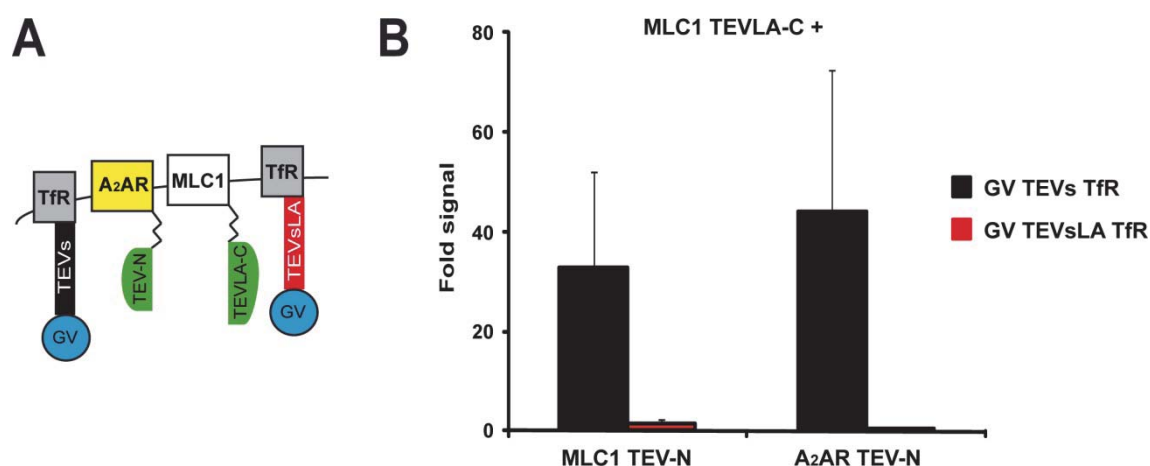


Figura 42. Utilització d'un enzim TEV de baixa afinitat. **A.** Representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental diferenciant els dos tipus de substrat. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A2AR, utilitzant un enzim de baixa afinitat pel substrat (TEVLA-C). Es diferencia la utilització d'un substrat d'alta afinitat (TEVs, en negre) i un substrat de baixa afinitat per la TEV (TEVsLA, en vermell). Dades corresponents a 4 experiments independents.

Si s'utilitzava el substrat d'alta afinitat i la TEV de baixa afinitat, no s'observaven diferències entre la senyal obtinguda en la interacció positiva i la obtinguda en la interacció negativa. A més a més, existia una gran variabilitat de la senyal obtinguda en cada experiment. Per altra banda, la utilització simultània de l'enzim i el substrat de baixa afinitat provocava una activitat luciferasa pràcticament nul·la en totes les condicions experimentals. Aquests resultats van fer descartar la utilització de l'enzim TEV de baixa afinitat per desenvolupar el mètode, però la utilització del substrat de baixa afinitat va generar certa millora de l'especificitat de la senyal del mètode.

6. DESENVOLUPAMENT DE LA VARIANT DEL MÈTODE QUE NO UTILITZA PROTEÏNA CARRIER.

La utilització d'una proteïna *carrier* podria ser un impediment alhora de trobar-se totes les parts implicades en el mètode. La variant del mètode que no utilitza aquesta

proteïna (**Figura 37 B**) implica que s'augmenti la concentració local de les proteïnes que han d'interaccionar i aquest fet pot significar un augment de l'especificitat de la senyal. Per això, es va fusionar el substrat de baixa afinitat (TEVsLA) i el factor de transcripció (GV) a la construcció que tenia MLC1 i el fragment N-terminal de TEV (MLC1 TEV-N), i es va dur a terme l'assaig de luminescència per validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció entre MLC1 i A₂AR (**Figura 43**).

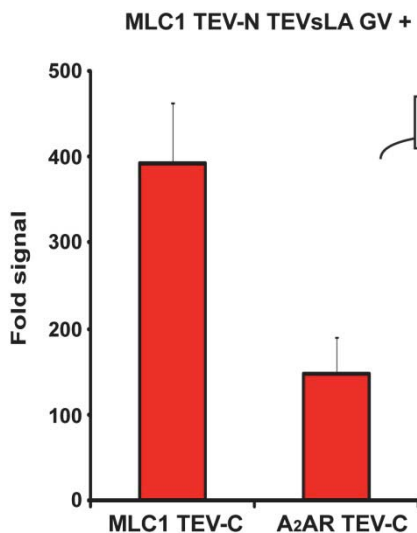


Figura 43. Desenvolupament del mètode sense proteïna *carrier*. Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR, fusionant el substrat de baixa afinitat i el factor de transcripció a una de les dues proteïnes d'estudi (MLC1 TEV-N TEVsLA GV). Es mostra una representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental (dins). Dades corresponents a 6 experiments independents.

Amb aquesta nova variant del mètode s'observava un augment de la inducció de la senyal, en general d'unes 10 vegades, ja que amb el substrat de baixa afinitat, es passava d'una senyal positiva de 40 *fold* d'inducció a una senyal positiva de 400 *fold* d'inducció. No obstant, la senyal corresponent a la interacció inespecífica també va augmentar al voltant de 6 vegades. Per tant, ens trobàvem pràcticament en les mateixes condicions que anteriorment però amb un augment significatiu de l'activitat de senyal per part de l'enzim reconstituït.

7. CANVIS EN L'EXPRESSIÓ DELS COMPONENTS DEL MÈTODE.

També es va voler comprovar si la interacció inespecífica era deguda a la sobreexpressió dels components del mètode. Una disminució de la concentració efectiva d'algun dels components del mètode es podria traduir en l'afectació de les interaccions inespecífiques exclusivament. Aquesta aproximació ja havia servit per poder trobar interaccions específiques entre proteïnes de membrana implicades en l'homeòstasi del colesterol (Yang et al., 2002).

Per això, es va construir el vector destí d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA6.2/V5-pL DEST, amb el promotor de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-TK) el qual proporciona nivells moderats d'expressió. Utilitzant

construccions que mantenien l'expressió de la *Gaussia luciferase* sota el control del promotor CMV o sota el control del promotor TK, es va comprovar que l'expressió controlada pel promotor TK era unes 130 vegades menor que l'expressió controlada pel promotor CMV (dades no mostrades).

Posteriorment, es van generar totes les construccions necessàries per dur a terme el mètode Split-TEV i es van fer assajos de luminescència per validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR, baixant l'expressió de cada component, utilitzant totes les combinacions possibles (**Figura 44**).

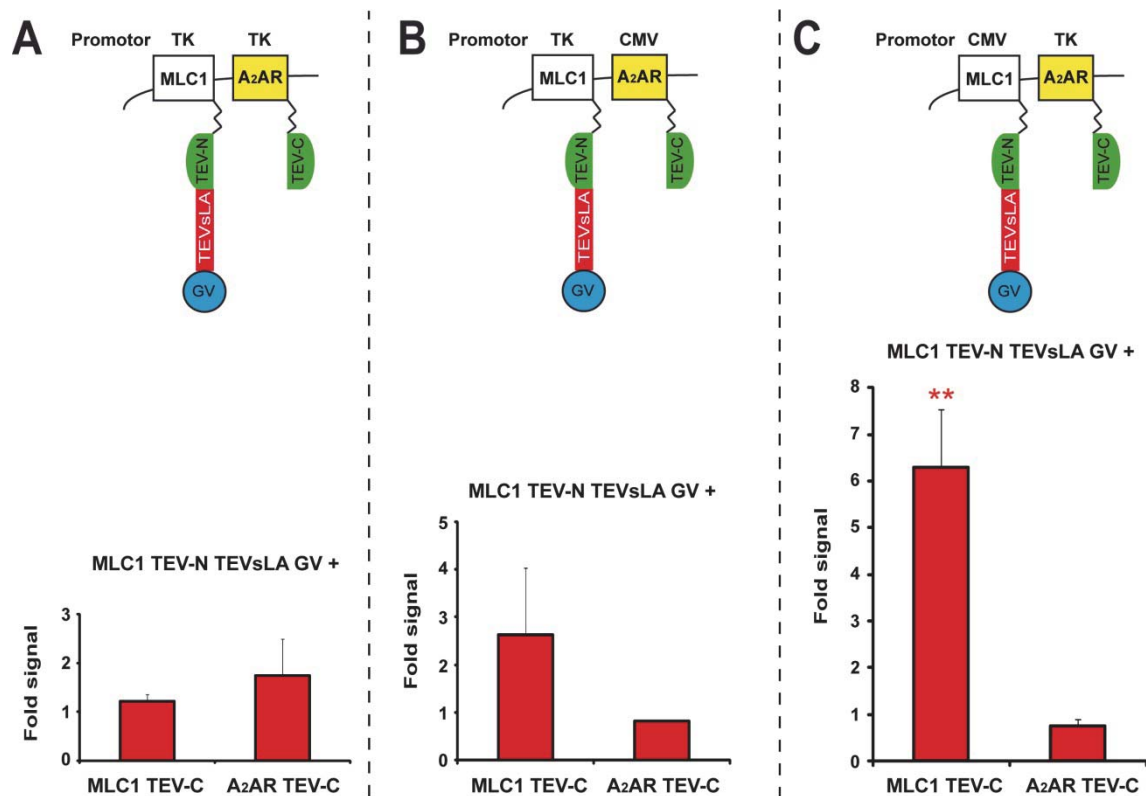


Figura 44. Nivells baixos d'expressió dels components del mètode Split-TEV. **A.** Inducció de senyal obtinguda en validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR, mantenint tots els components sota el control d'un promotor de baixa afinitat (TK). Es mostra la representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental. Dades corresponents a 3 experiments independents. **B.** Inducció de senyal obtinguda en validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR, mantenint el component que té fusionat el substrat i el factor de transcripció (MLC1 TEV-N TEVsLA GV) sota el control d'un promotor de baixa afinitat (TK). Es mostra la representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental. Dades corresponents a 3 experiments independents. **C.** Inducció de senyal obtinguda en validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR, mantenint el component que té fusionat l'extrem C-terminal de la TEV (TEV-C) sota el control d'un promotor de baixa afinitat (TK). Es mostra la representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental. Dades corresponents a 8 experiments independents. ** p < 0.01; respecte el control negatiu; t-student no aparellada.

Es va observar que en reproduir el mètode amb tots els components sota el control del promotor de baixa expressió TK, s'obtenien uns nivells d'inducció de senyal pràcticament nuls (**Figura 44 A**). Per altra banda, també s'observaven nivells molt

baixos de senyal quan s'utilitzava el constructe que contenia fusionat el substrat de baixa afinitat i el factor de transcripció sota el control del promotor de baixa expressió (**Figura 44 B**). Aquestes dues condicions experimentals van mostrar que, si es mantenia el factor de transcripció sota el control d'un promotor de baixa expressió no era possible realitzar el mètode Split-TEV, ja que la senyal produïda per la reconstitució enzimàtica i la senyal de soroll de fons eren semblants i s'obtenien uns nivells d'inducció de senyal pràcticament nuls. En canvi, es van observar diferències significatives entre la senyal positiva i la negativa quan es mantenia el component que tenia fusionat únicament el fragment TEV-C sota el control del promotor de baixa expressió (**Figura 44 C**). Tot i això, en baixar l'expressió de qualsevol dels elements del mètode hi havia una caiguda dràstica dels nivells d'inducció de senyal, ja que es passava de nivells de l'ordre de 400 *fold* (**Figura 43**) a nivells de l'ordre de 6 *fold* (**Figura 44 C**).

Per poder validar la interacció entre MLC1 i les proteïnes candidates a formar part del seu interactoma (Resultats i discussió. Capítol 2), era necessari augmentar els nivells d'interacció específica. Per això, es va implementar aquesta variant del mètode utilitzant novament el substrat d'alta afinitat per l'enzim TEV. Es va construir la fusió del factor de transcripció (GV) amb el substrat d'alta afinitat (TEVs) i el fragment TEV-N i es va fusionar a MLC1 per realitzar els assajos de validació de l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR (**Figura 45**).

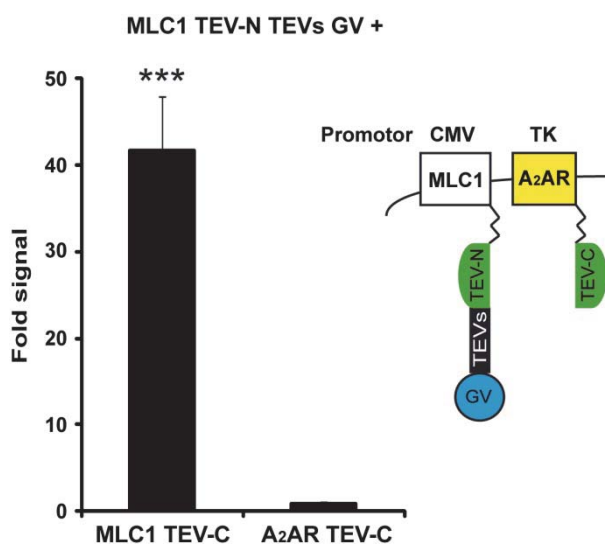


Figura 45. Variant final del nou mètode Split-TEV. Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de MLC1 i la no interacció MLC1-A₂AR. Es manté la primera proteïna d'interès (MLC1) fusionada al fragment TEV-N, el substrat d'alta afinitat (TEVs) i el factor de transcripció (GV), sota el control del promotor CMV i la segona proteïna d'interès (MLC1 o A₂AR) fusionada al fragment TEV-C sota el control del promotor de baixa expressió TK. Es mostra una representació esquemàtica de les construccions utilitzades en una condició experimental. Dades corresponents a 11 experiments independents. *** p<0.001; respecte el control negatiu; t-student no aparellada.

Amb aquesta última modificació, es va aconseguir augmentar molt els nivells d'inducció de senyal específica, ja que la senyal produïda pel control positiu va augmentar fins al voltant de 40 *fold* d'inducció mentre que la senyal produïda per la interacció negativa no va registrar cap mena de canvi.

Finalment, s'havia arribat a una activitat específica prou alta per utilitzar el mètode Split-TEV com a mètode per validar interaccions entre proteïnes de membrana.

8. VALIDACIÓ DE LA NOVA VARIANT DEL MÈTODE.

Per comprovar la nova variant del mètode obtinguda, es va realitzar la validació de la interacció de diferents tipus de proteïnes de membrana. Aquests experiments es van realitzar juntament amb la Dra. Tania López (**Figura 46**).

Primer es va estudiar les interaccions proteïna-proteïna entre membres de la família GPCR (**Figura 46 A**). Es va reproduir l'homodimerització de la proteïna D₂R i l'heterodimerització entre D₂R i A₂AR (Ciruela et al., 2011), mentre que no es va observar interacció entre D₂R i MLC1.

Per altra banda, es van estudiar els canals iònics de transport de clorur de la família de CIC, els quals són capaços d'oligomeritzar (Jentsch et al., 2005). Utilitzant la nova variant del mètode, es va detectar l'homodimerització dels canals CIC-2 i CIC-1 (**Figura 46 B i C**) i a més a més es va poder detectar l'heterodimerització entre CIC-2 i CIC-1 que també havia estat descrita (Lorenz et al., 1996). En canvi, no es va generar interacció amb el canal CIC-5 de la mateixa família, ni amb el receptor A₂AR, ni amb 4F2hc.

També es va estudiar per aquest mètode la capacitat d'oligomeritzar del transportador glial de glutamat GLT-1. Aquesta oligomerització ha estat demostrada a partir d'estudis estructurals (Yernool et al., 2004). Es va poder validar l'homodimerització de GLT-1 mentre que no presentava interacció amb A₂AR (**Figura 46 D**).

Finalment, aquest mètode va ajudar al grup a identificar la molècula d'adhesió GlialCAM com a bon candidat a formar part de l'interactoma de MLC1 (Resultats i discussió. Capítol 2). Així, juntament amb altres estudis genètics i bioquímics es va poder demostrar que GlialCAM era el segon gen de malaltia de MLC i que interaccionava directament amb MLC1 (López-Hernández et al., 2011a, 2011b). L'homodimerització tant de MLC1 com de GlialCAM i l'heterodimerització entre aquestes dues proteïnes també va ser detectada amb la nova variant del mètode Split-TEV (**Figura 45 i Figura 46 E i F**).

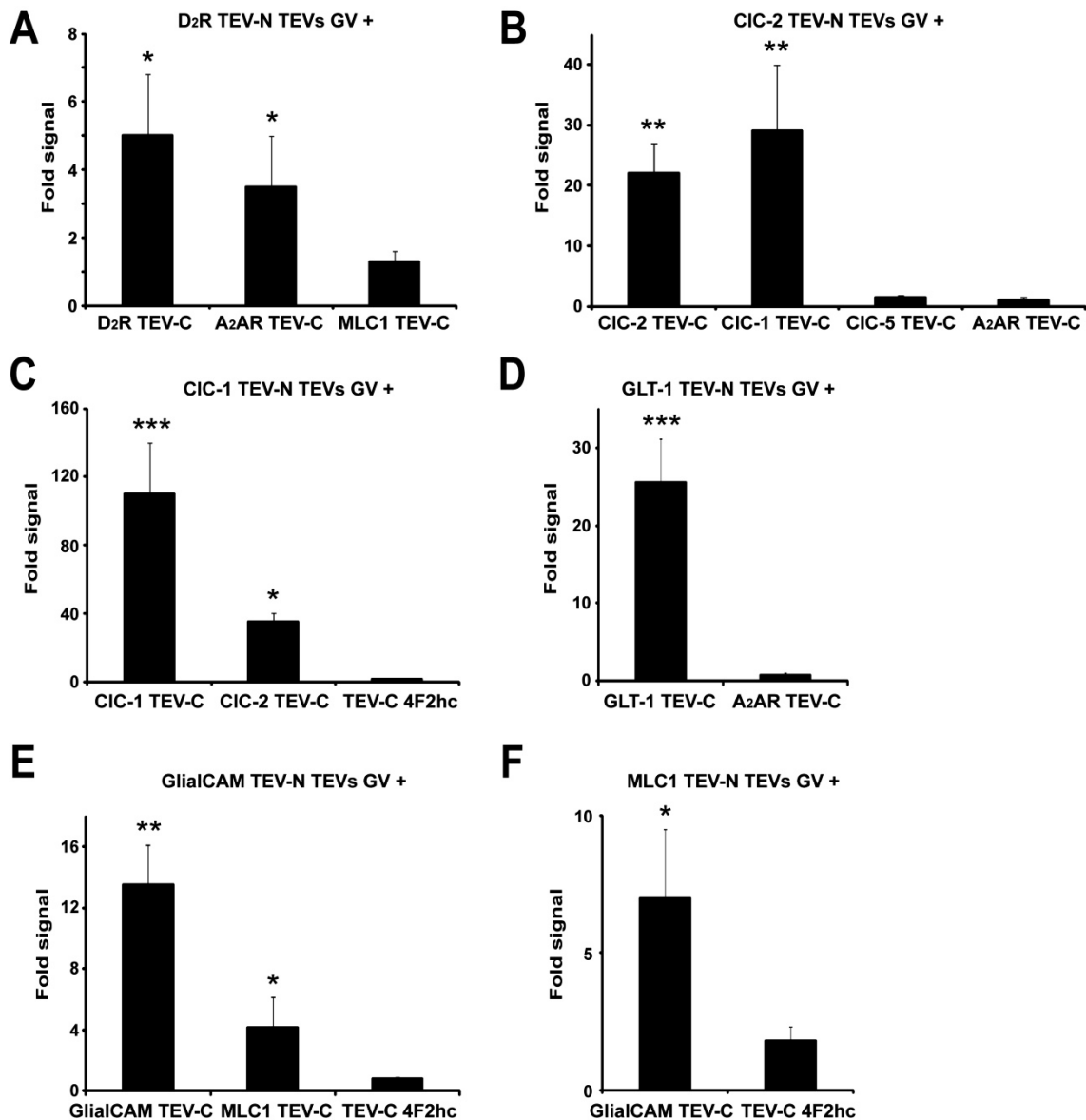


Figura 46. Validació de la nova variant del mètode Split-TEV per diferents proteïnes de membrana. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de D₂R i l'heterodimerització entre D₂R i A₂AR com a components de la família GPCR. Com a control negatiu es mostra la no interacció D₂R-MLC1. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de CIC-2 i la interacció entre CIC-2 i CIC-1. Com a controls negatius s'utilitzen el canal CIC-5 i el receptor A₂AR. **C.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de CIC-1 i la interacció entre CIC-1 i CIC-2. Com a control negatiu s'utilitza 4F2hc. **D.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització del transportador de glutamat glial GLT-1. Com a control negatiu s'utilitza A₂AR. **E.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar l'homodimerització de GlialCAM i la interacció GlialCAM-MLC1. Com a control negatiu s'utilitza 4F2hc. **F.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar la interacció entre MLC1 i GlialCAM. Com a control negatiu s'utilitza 4F2hc. Dades corresponents a 3 experiments independents com a mínim. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 respecte cada control negatiu; t-student no aparellada.

9. DISCUSSIÓ.

Les tècniques d'estudi de les interaccions entre proteïnes de membrana estan en constant desenvolupament. Actualment el mètode més utilitzat és el sistema *Split-ubiquitin* que és un sistema d'expressió en llevats, però interessa poder provar les

interaccions en sistemes més propers a l'entorn cel·lular real. El mètode Split-TEV d'expressió en cèl·lules de mamífer proporciona aquesta possibilitat i a més a més, ofereix una gran flexibilitat ja que la senyal produïda per les interaccions està amplificada degut a l'activació de la transcripció d'un gen reporter. El mètode Split-TEV amb qualsevol de les seves variants ja ha estat utilitzat per identificar interaccions entre proteïnes de membrana amb èxit (Wehr et al., 2006, 2008), però s'ha pogut comprovar que el mètode descrit no és vàlid per totes les proteïnes de membrana i necessita millores. Segurament, les proteïnes que tenen un major percentatge d'aminoàcids hidrofòbics i que tenen més tendència a agregar-se presenten més dificultats a l'hora d'estudiar les seves interaccions. Per això, s'han realitzat modificacions al mètode per augmentar l'especificitat i la sensibilitat a l'hora d'identificar interaccions entre proteïnes de membrana complexes.

En altres mètodes de complementació de proteïnes com el BiLC (*Bimolecular Luminescence Complementation*), la complementació dels fragments és reversible (Remy and Michnick, 2006), fet que pot provocar que únicament les interaccions amb més afinitat es puguin detectar. En canvi, la TEV proteasa presenta una reconstitució irreversible (Gray et al., 2010) que juntament amb l'amplificació causada pel gen reporter, fa que sigui un mètode més efectiu en la identificació de qualsevol tipus d'interacció. Aquesta amplificació de l'activitat de la TEV causada pel gen reporter, provoca una condició de saturació del sistema que fa que l'activitat de l'enzim reconstituït sigui pròxima a l'activitat de l'enzim sencer. En altres mètodes PCA com el BiLC o el BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), l'activitat obtinguda per la reconstitució de la proteïna fragmentada representa únicament un 10% de l'activitat de la proteïna sencera..

No obstant, s'han de tenir en compte certes limitacions del mètode Split-TEV utilitzat. La generació de falsos positius degut a l'amplificació de la senyal d'activitat i la sobreexpressió dels components del mètode, pot generar problemes a l'hora de validar interaccions entre proteïnes de membrana. Per exemple, la interacció entre LAT-2 i 4F2hc (Pineda et al., 1999) no s'ha pogut validar degut a la senyal inespecífica obtinguda al soroll de fons d'aquella conformació del mètode. Per altra banda, és un mètode que no permet observar la localització de les proteïnes utilitzades i per tant, no s'obté informació del compartiment cel·lular on té lloc la interacció. Aquesta informació si que es pot estudiar mitjançant BiFC per exemple. A més a més, la fusió del fragment enzimàtic de TEV i/o el factor de transcripció pot provocar la retenció de les proteïnes al reticle endoplasmàtic i facilitar la generació de falsos positius. Tampoc es poden

realitzar estudis d'interaccions dinàmiques entre proteïnes degut a la reconstitució irreversible de TEV i la transcripció del gen reporter.

Paral·lelament a la millora del mètode Split-TEV, la Dra. Tania López va posar a punt altres mètodes de complementació de proteïnes (PCA), com el BiLC on es complementa la *Gaussia luciferase*, o el BiFC on es complementa la proteïna fluorescent Venus. Es van comparar els resultats obtinguts amb la nova variant de Split-TEV i els obtinguts amb el mètode BiLC i es va veure que la nova variant de Split-TEV oferia més sensibilitat a l'hora de validar les interaccions entre els membres de la família de GPCR, entre els canals de clorur de la família de CIC o entre les proteïnes implicades en MLC, MLC1 i GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2012).

A més a més, aquesta manera de realitzar el mètode utilitzant l'expressió del gen de la *Gaussia luciferase* secretable, fa que la detecció de la interacció sigui tècnicament senzilla i el fet de treballar amb el sobrenedant, fa que les cèl·lules es puguin utilitzar per altres assajos, com en el nostre cas, realitzar l'assaig de β -galactosidasa per tenir un control dels nivells de transfecció. Tot això, facilita que aquesta variant del mètode pugui ser utilitzada per assajos de *screening* a gran escala per poder identificar diferents candidats a formar part de l'interactoma d'una certa proteïna.

En conclusió, aquesta nova variant de Split-TEV és un mètode eficaç per identificar interaccions entre proteïnes de membrana complexes en cèl·lules de mamífer, amb alta sensibilitat i alta especificitat mitjançant una metodologia senzilla i robusta.

CAPÍTOL 2

Anàlisis de les proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1.

1. INTRODUCCIÓ.

El desconeixement de la funció de MLC1 fa difícil entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia MLC, i per tant no s'han pogut desenvolupar teràpies pels pacients afectats. Per això, conèixer la xarxa proteica o interactoma amb la qual MLC1 està interaccionant pot permetre entendre quin paper fisiològic ocupa la proteïna a la cèl·lula.

La majoria de les proteïnes efectuen la seva funció dins de complexes xarxes de macromolècules interconnectades (Cusick et al., 2005). És per això que les interaccions proteïna-proteïna són essencials per pràcticament tots els processos cel·lulars. Així, identificar, quantificar i localitzar les xarxes d'interacció entre proteïnes és un requisit indispensable per entendre les bases biofísiques de qualsevol procés cel·lular (Morsy et al., 2008).

Les dues metodologies més emprades per mapar interaccions entre proteïnes són el sistema de doble híbrid en llevats (Y2H) i la immunoprecipitació per afinitat seguida d'espectrometria de masses (AP-MS) (Cusick et al., 2005; Morsy et al., 2008; Williamson and Sutcliffe, 2010). El sistema de doble híbrid en llevats (Fields and Song, 1989) utilitza la naturalesa dels factors de transcripció que contenen dominis d'unió al DNA i dominis d'activació. Quan aquests dominis estan separats, el factor de transcripció no és funcional. En canvi, si cada domini és fusionat a dues proteïnes que interaccionen, la funció del factor de transcripció pot ser restaurada per transcriure un o més gens reporters que permetran visualitzar el fenomen d'interacció. Aquest mètode s'utilitza per identificar interaccions binàries entre proteïnes. Per altra banda, la immunoprecipitació per afinitat seguida d'espectrometria de masses (AP-MS) es sol utilitzar per realitzar el mapatge de les proteïnes que formen part de complexes proteics, identificant interaccions directes entre dues proteïnes, però també associacions indirectes entre proteïnes que formen part del mateix complex (Williamson and Sutcliffe, 2010). El complex purificat és analitzat amb un gel *SDS/PAGE* i els membres obtinguts són posteriorment identificats per espectrometria de masses (MS).

2. IDENTIFICACIÓ DE CANDIDATS.

Es van obtenir un conjunt de proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1 seguint les dues tècniques més utilitzades. Per una banda, es van realitzar tècniques genètiques basades en la metodologia del doble híbrid *Split-ubiquitin*

mitjançant els serveis de l'empresa *Dualsystems*, i per altra banda, es van realitzar tècniques de proteòmica en col·laboració amb l'empresa *Logopharm*.

2.1. Candidats obtinguts mitjançant el sistema *Split-ubiquitin DUALmembrane*.

El sistema *DUALmembrane* permet la detecció d'interaccions entre proteïnes de membrana, fet que no permet el sistema de doble híbrid clàssic. Es basa en la reconstitució de la ubiquitina, el reconeixement per part de les proteases ubiquitina específiques (UBPs) i la posterior alliberació d'un factor de transcripció que activa la transcripció de gens reporters. Per realitzar aquest mètode es necessiten dos vectors: el *bait* i el *prey*. El *bait* es va construir fusionant a la part C-terminal de MLC1, la part C-terminal de la ubiquitina i el factor de transcripció GAL4VP16 (vector pBT3-N; P03230). El *prey* es va construir fusionant la part N-terminal de la ubiquitina a una llibreria de cervell (vector pPR3-N; P03234). La interacció entre el *bait* i el *prey* farà reconstituir les dues meitats de la ubiquitina i posteriorment, les UBPs presents en el llevat alliberaran el factor de transcripció present en el *bait*. Aquest factor de transcripció anirà al nucli i activarà la transcripció de gens reporters del llevat que en el nostre cas van ser leupeptina, histidina, triptòfan i β -Gal.

Un cop realitzat l'*screening* genètic per *Dualsystems*, es van obtenir 104 clons positius que en el laboratori es van aïllar, transformar en bacteris per obtenir DNA i aquest DNA es va quantificar, digerir per comprovar que tenia l'insert del *bait* i finalment seqüenciar. Aquestes seqüències es van abocar a una base de dades mitjançant el programa *BLAST* i de tots els clons analitzats es van obtenir 4 possibles clons positius: la proteïna d'estrès associada al reticle endoplasmàtic SERP1 (Yamaguchi et al., 1999), la tetraspanina CD9 típica d'unions cel·lulars (Deissler et al., 2007), la proteïna bàsica de la mielina MBP (Boggs, 2006) i la proteïna d'unió a calci calsequestrina 1 CASQ1 (Beard et al., 2004). L'empresa *Dualsystems* va retransformar els clons i va revalidar únicament **SERP1** i **CD9**.

2.2. Candidats obtinguts mitjançant tècniques de proteòmica.

Els estudis de proteòmica es van realitzar en col·laboració amb l'empresa *Logopharm*, combinant tècniques de purificació per afinitat amb mètodes de proteòmica quantitativa basats en la cromatografia líquida (LC) i l'espectrometria de masses (MS).

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	gi 157823887	44	1,25	0,56	0,77	1,45	0,77	0,64	1,07	0,68	0,48
phosphodiesterase 2A	gi 13592021	105	0,000	0,010	0,000	0,029	0,010	0,029	0,124	0,095	0,019
NBC-like 1	gi 9437326	123	0,130	0,049	0,016	0,211	0,146	0,033	0,106	0,081	0,024
Furry-homolog-like	gi 119964716	337	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,042	0,030
ZO-1	gi 6678355	195	0,051	0,005	0,005	0,031	0,000	0,000	0,051	0,036	0,000
ZO-2	gi 160333863	131	0,015	0,000	0,031	0,000	0,015	0,015	0,015	0,031	0,000
FATP-1	gi 2492888	72	0,000	0,000	0,000	0,014	0,042	0,000	0,028	0,042	0,056
HepaCAM	gi 56790921	46	0,435	0,152	0,304	0,000	0,000	0,000	0,065	0,043	0,000
Reticulocalbin 2	gi 4506457	37	0,000	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
tweety homolog 1	gi 149016622	33	0,091	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Reticulon-3	gi 5174655	26	0,115	0,077	0,000	0,077	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
Reticulon-4 (Nogo-A)	gi 13929188	126	0,032	0,111	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,079	0,000
Reticulon-1	gi 45827776	24	0,167	0,292	0,000	0,000	0,083	0,000	0,125	0,125	0,000
Highaff Glutamate transporter GLT	gi 10121878	62	0,161	0,000	0,000	0,226	0,097	0,065	0,129	0,097	0,032
N-cadherin (2)	gi 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	gi 149065216	27	0,000	0,000	0,000	0,111	0,037	0,074	0,074	0,037	0,037
Oligodendrocyte glycoprotein	gi 2497314	28	0,000	0,000	0,000	1,179	0,036	0,214	0,679	0,143	0,071
hexokinase	gi 309289	102	0,000	0,000	0,000	0,069	0,059	0,029	0,000	0,000	0,000
UDP-glucose pyrophosphorylase	gi 67078526	57	0,439	0,000	0,000	0,140	0,000	0,000	0,070	0,000	0,000
LOC67306 or T03G11.3	gi 157817901	35	0,000	0,114	0,000	0,000	0,229	0,000	0,057	0,286	0,000
ClCC1 (CLIC-like chloride channel)	gi 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)	gi 4115909	115	0,000	0,017	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,052	0,000

Taula 4. Descripció dels resultats obtinguts per estudis de proteòmica (els valors indiquen abundància). Els 3 anticossos utilitzats són: 2 anticossos contra l'extrem N-terminal de la proteïna MLC1 de ratolí (154 i 155) i un anticòs contra l'extrem N-terminal de la proteïna MLC1 humana (hN). La primera ronda de purificació utilitzant *complexyolite 82* es representa a les 3 últimes columnes. La segona ronda de purificació utilitzant *complexyolite 82* i *complexyolite 47a* es representa a les 6 primeres columnes. Verd: consistència total (trobada específicament en almenys 5 de 9 purificacions). Blau: trobada amb la majoria de anticossos utilitzant *complexyolite 82*. Vermell: trobada amb la majoria d'anticossos utilitzant *complexyolite 47a*. Groc: trobada consistentment però només amb un anticòs.

Es van realitzar coimmunoprecipitacions a partir de cervell de rata i ratolí solubilitzats amb una barreja de detergents anomenada *complexyolite 82* i utilitzant quatre anticossos diferents contra MLC1. Posteriorment es va analitzar per LC-MS i es va

obtenir una llista de candidats a interaccionar amb MLC1 que no presentava cap coincidència amb la obtinguda amb les tècniques genètiques. Des del laboratori es va suggerir repetir les immunoprecipitacions utilitzant unes condicions més suaus de solubilització per augmentar les possibilitats d'èxit. En aquesta nova ronda es van realitzar purificacions d'afinitat solubilitzant membranes de cervell de rata i ratolí amb la barreja de detergents *complexolyte 47a*. Després de l'anàlisi es van trobar un seguit de proteïnes candidates a interaccionar amb MLC1 (**Taula 4**).

Els candidats més significatius i interessants identificats per LC-MS tenint en compte totes les rondes de solubilització van ser la fosfodiesterasa 2A **PDE2A** (Hepp et al., 2007), el cotransportador de sodi-bicarbonat **NBC** (Østby et al., 2009), la proteïna d'unions tipus *tight* **ZO-1** (Fanning and Anderson, 2009), la molècula d'adhesió **HepaCAM** (Favre-Kontula et al., 2008), el transportador de glutamat glial **GLT-1** (Kanai and Hediger, 2004) i el putatiu canal de clorur **Tweety1** (Suzuki and Mizuno, 2004).

3. ESTUDIS DE VALIDACIÓ DELS CANDIDATS.

Després dels estudis genètics i proteòmics, el grup posseïa una llarga llista de possibles proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1 i que també podien ser el possible segon gen de malaltia.

Es va decidir dividir la llista de proteïnes en dos grups:

1. Proteïnes típiques d'unions cel·lulars, ja que MLC1 es localitza en unions entre astròcits (Duarri et al., 2011).
2. Proteïnes amb funció de canal iònic o transportador, ja que el fenotip vacuolitzant dels pacients amb MLC suggereix que la proteïna MLC1 pot estar involucrada en la translocació d'ions a través de la superfície cel·lular.

En aquesta Tesi, es va treballar amb les proteïnes relacionades amb el transport d'ions a través de la membrana. Dels estudis de proteòmica es van seleccionar **GLT-1**, **NBC** i **TTYH1**. A més a més, es va decidir afegir com a candidata la proteïna **TRPC4** (*transient receptor potential canonical*), escollida a partir de la recerca bibliogràfica ja que es troba a les unions astrocitàries.

GLT-1 és un membre de la família de transportadors de glutamat d'alta afinitat que presenta una expressió astrocitària en còrtex i hipocamp. Aquest transportador capta el glutamat cap als astròcits on és metabolitzat a glutamina, fent que es mantingui baixa la concentració extracel·lular de glutamat a l'espai sinàptic. La baixa concentració de glutamat a l'espai sinàptic és essencial per una bona activació

sinàptica i per prevenir el dany neuronal per sobreactivació, per tant GLT-1 també té un rol de neuroprotecció. Aquest fet provoca que els ratolins *knock-out* per aquesta proteïna presentin dany cel·lular, epilèpsia i símptomes de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o l'Esclerosi lateral amiotròfica (Anderson and Swanson, 2000; Kanai and Hediger, 2004; Pawlak et al., 2005; Tanaka et al., 1997).

NBC és un membre de la família de cotransportadors de sodi i bicarbonat que presenta una expressió majoritàriament en cèl·lules glials. En resposta a l'augment de la concentració de potassi extracel·lular degut a l'activitat neuronal, NBC capta sodi i bicarbonat a l'interior dels astròcits. Aquest bicarbonat intracel·lular provoca l'activació de la glicòlisi i la generació de lactat, que és excretat novament a l'espai extracel·lular i utilitzat per les neurones com a font energètica. Per tant, s'ha suggerit que NBC pot tenir un rol de modulació de l'activitat neuronal i de potenciació a llarg termini. Per altra banda, l'entrada de sodi i bicarbonat als astròcits provoca una disminució del pH que tendeix a inhibir l'activitat neuronal degut a la inhibició de canals de voltatge sensibles a pH. Aquest model de *feedback* negatiu s'ha suggerit com a model neuroprotector sota condicions patològiques associades a la isquèmia cerebral. (Annunziato et al., 2013; Choi et al., 2012; Østby et al., 2009; Schmitt et al., 2000).

TTYH1 (Tweety1) és un homòleg de la família de *tty* de *Drosophila melanogaster* present en mamífers. S'expressa en el teixit neural entre altres i es troba sobre regulat en astrocitomes i gliomes. És una proteïna de membrana amb 5 dominis transmembrana predits, que es localitza als contactes entre cèl·lules i al llarg dels axons neuronals. S'ha hipotetitzat que TTYH1 podria ser un membre d'una nova família de canals de clorur independents de calci activats en condicions hipoosmòtiques. Per tant, la hipotètica funció d'aquesta proteïna podria estar relacionada amb el manteniment de la homeòstasi dels fluids cel·lulars i el control del volum cel·lular. Per altra banda, s'ha suggerit que pot estar implicat en processos d'adhesió cel·lular i funció de receptor cel·lular (Matthews et al., 2007; Suzuki and Mizuno, 2004).

TRPC4 és un membre de la família de canals de transport de cations no selectius, que consta de 7 membres. Aquests canals transporten sodi, potassi o calci i són activats per receptors acoblats a proteïnes G. TRPC4 és una proteïna de membrana formada per 6 fragments transmembrana que formen un únic porus i els extrems N-terminal i C-terminal es localitzen a l'interior cel·lular. S'expressa en el sistema nerviós central, particularment en poblacions neuronals durant el desenvolupament. Es localitza en els

contactes entre cèl·lules degut a la seva interacció amb proteïnes d'unions cel·lulars com ZO-1 o Cx 43. Funcionalment actua com a canal d'entrada de calci independent de voltatge i per tant, s'ha relacionat amb la regulació de la homeòstasi del calci controlant els nivells de calci intracel·lular. Aquest mecanisme està involucrat en el creixement neuronal, la direccionalitat axonal, l'excitabilitat cel·lular i la plasticitat sinàptica, alhora que controla l'expressió gènica i la mort cel·lular (Boisseau et al., 2009; Fowler et al., 2007; Malarkey et al., 2008; Song et al., 2005).

Un altre canal que es va considerar interessant d'estudiar va ser el canal de clorur **CIC-2** que també es troba present a les unions cel·lulars (Sik et al., 2000) i a més a més, els ratolins *knock-out* per aquest gen presenten un fenotip vacuolitzant similar al dels pacients amb MLC (Blanz et al., 2007). Aquest canal CIC-2, juntament amb les proteïnes d'unions cel·lulars CD9, ZO-1, Claudina-1 i HepaCAM (o GlialCAM) van ser estudiades en paral·lel per la Dra. Tania López.

Un cop s'havia decidit quines proteïnes candidates eren les més interessants, era necessari validar les interaccions obtingudes amb diferents metodologies.

La primera aproximació que es va voler realitzar va ser la coimmunolocalització amb MLC1 en cultius primaris d'astròcits de rata, ja que MLC1 s'expressa de forma endògena. No es podien obtenir els anticossos comercials per cada una de les proteïnes i a més a més, els que ja es disposaven, en molts casos no funcionaven correctament. Per tant, es va optar per l'adició d'epítops o *tags* a les proteïnes candidates per realitzar els assajos de coimmunofluorescència. Per això, es van clonar tots els gens identificats com a candidats mitjançant la metodologia *Multisite Gateway* (Invitrogen) i se'ls hi van fusionar 3 epítops Flag o HA tant a l'extrem N-terminal com a l'extrem C-terminal, ja que estudis previs havien demostrat que els anticossos contra aquests epítops són molt efectius.

La segona aproximació va ser utilitzar els mètodes de complementació de fragments de proteïnes posats apunt al laboratori com Split-TEV, BiLC o BiFC, per validar la interacció directa i específica de cada candidat amb MLC1.

Un cop la interacció hagués estat confirmada per aquestes metodologies, es podria procedir a un estudi funcional de la interacció per obtenir informació sobre la funció de MLC1 o a un estudi genètic on s'obtindria informació sobre si algun gen candidat era gen responsable de la malaltia.

3.1. Validació de la colocalització dels candidats amb MLC1 en cèl·lules.

L'adició d'epítops a les proteïnes candidates podia afectar l'expressió i/o el correcte plegament i localització d'aquestes. Per això, es van estudiar els nivells d'expressió per WB i la localització per immunofluorescència de totes les construccions realitzades en cèl·lules HeLa.

Primerament, es va observar que l'adició dels epítops Flag i HA a l'extrem N-terminal de cada candidat generava molts problemes, ja que en alguns casos la proteïna no arribava a expressar-se i en els casos que ho feia, la proteïna es mostrava completament retinguda (dades no mostrades). L'adició dels epítops Flag i HA a l'extrem C-terminal en canvi, va resultar millor per la correcta expressió i localització de la majoria de les proteïnes candidates estudiades (**Figura 47**).

Les construccions de GLT-1, NBC i TTYH1 tant amb Flag com amb HA s'expressaven correctament i presentaven bons nivells d'expressió, mentre que les construccions de TRPC4 amb cadascun dels dos epítops s'expressaven correctament, però amb uns nivells d'expressió inferiors (**Figura 47 A**).

En quan a la localització cel·lular, GLT-1 presentava una correcta localització a la membrana cel·lular amb la fusió de qualsevol dels dos epítops. NBC i TRPC4 presentaven una marca clara a la membrana cel·lular quan contenien l'epítop Flag, però la fusió de HA els hi generava problemes de retenció intracel·lular. Finalment, en el cas de TTYH1, l'adició de qualsevol dels dos epítops provocava la retenció intracel·lular de la proteïna candidata i per tant, no es va aconseguir localitzar-la correctament a la membrana plasmàtica (**Figura 47 B**).

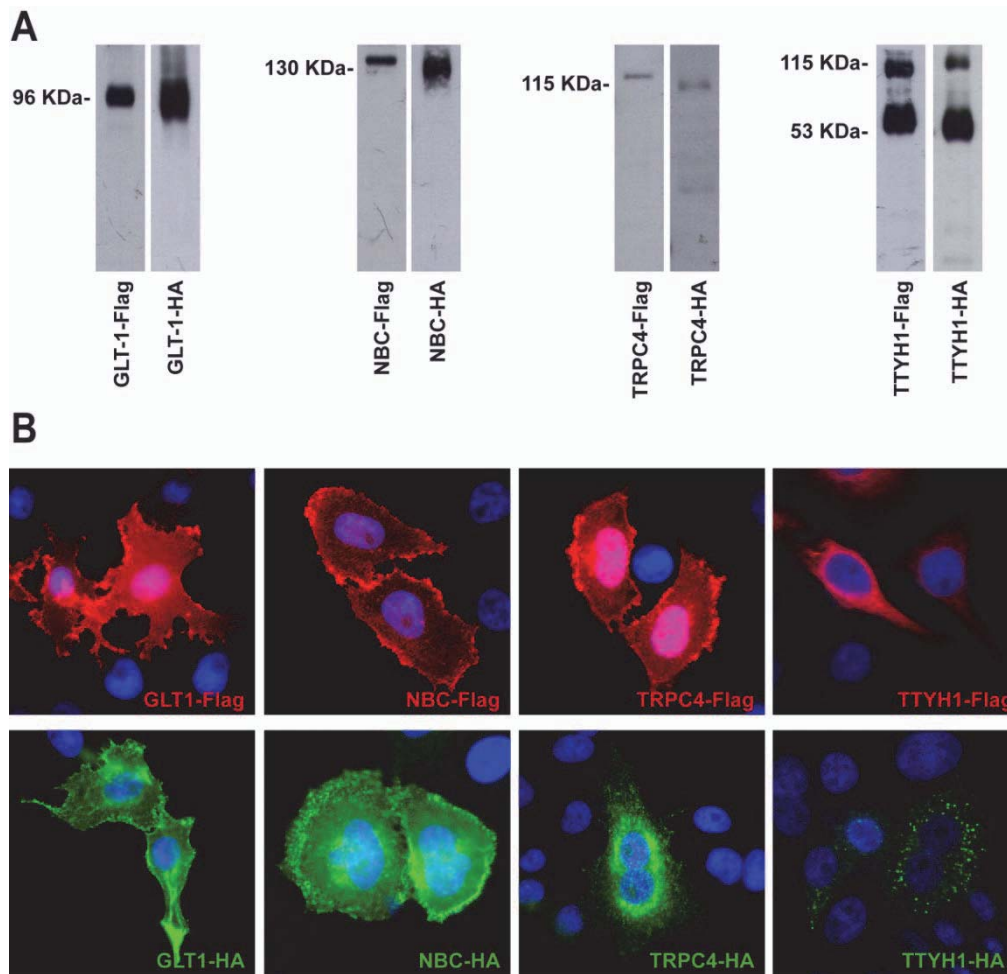


Figura 47. Expressió i localització de les proteïnes candidates GLT1, NBC, TRPC4 i TTYH1 amb els epítops Flag i HA fusionats a l'extrem C-terminal. Cèl·lules HeLa transfectades amb els constructes corresponents i analitzades per WB (A) o immunofluorescència (B) utilitzant els anticossos comercials contra Flag o HA.

Després de l'estudi en cèl·lules HeLa es va procedir a estudiar les proteïnes candidates en cultius primaris d'astròcits de rata. Aquests astròcits eren cultivats durant 3 setmanes mantinguts amb el cicle cel·lular aturat mitjançant Ara-C, per afavorir la diferenciació a una determinada morfologia (Resultats i discussió. Capítol 3) (Duarri et al., 2011). Aquest model astrocitari mostrava una localització de MLC1 a unions de contacte entre astròcits. L'estudi amb el model astrocitari es va realitzar amb les construccions que presentaven l'epítop Flag fusionat a l'extrem C-terminal degut als millors resultats obtinguts en cèl·lules HeLa.

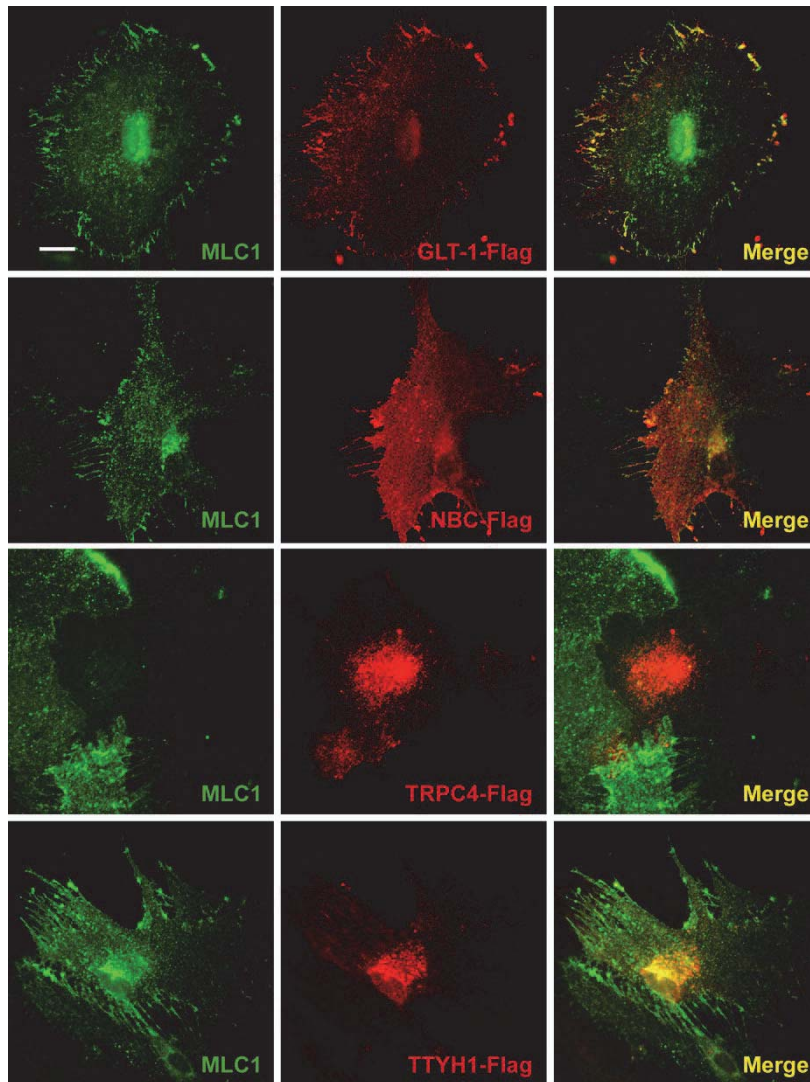


Figura 48. Colocalització de les proteïnes candidates GLT1, NBC, TRPC4 i TTYH1 amb MLC1 en astròcits primaris de rata. Cultius d'astròcits primaris de rata aturats en el cicle cel·lular durant 3 setmanes amb Ara-C, transfectats amb les construccions corresponents a les proteïnes candidates amb els epítops Flag fusionats a l'extrem C-terminal i estudiats per immunofluorescència. Es mostra la marca de MLC1 (en verd) utilitzant un anticòs contra la part N-terminal de la proteïna de ratolí, i la marca de cada candidat (en vermell) utilitzant l'anticòs comercial contra Flag. La colocalització es mostra en la superposició de les dues imatges (merge, en groc). Barra, 20 µm.

Es van transfectar astròcits amb cada proteïna candidata i es va estudiar per immunofluorescència la colocalització amb MLC1 a les unions astrocitàries (**Figura 48**). TTYH1 i TRPC4 es mostraven completament retinguts intracel·lularment i per tant no presentaven cap tipus de colocalització amb MLC1. En canvi, GLT-1 i NBC sí que es localitzaven a les unions astrocitàries i per tant, colocalitzaven parcialment amb MLC1.

Un cop acabat l'estudi en astròcits es va decidir considerar com a possibles candidats d'interacció amb MLC1 a GLT-1 i NBC, ja que mostraven una colocalització parcial amb MLC1 a les unions astrocitàries del model.

3.2. Validació de la interacció dels candidats amb MLC1 mitjançant Split-TEV.

Es va procedir a validar la interacció d'aquestes dues proteïnes candidates amb MLC1, mitjançant el mètode de complementació proteica Split-TEV.

Per realitzar aquest estudi es va clonar GLT-1 i NBC amb els fragments de la proteasa TEV per introduir-los al mètode. Es van generar les corresponents construccions per poder validar la interacció MLC1-GLT-1 i MLC1-NBC o la interacció inversa GLT-1-MLC1 i NBC-MLC1 i es va procedir a realitzar els assajos de luminescència (**Figura 49**).

Es va observar que la senyal d'inducció obtinguda amb la interacció MLC1-GLT-1 o MLC1-NBC era molt petita, fet que generava problemes a l'hora de validar interaccions amb aquesta conformació. Tot i així, es van observar diferències significatives respecte el control negatiu, tant amb la interacció entre MLC1 i GLT-1 com amb la interacció MLC1-NBC (**Figura 49 A**).

Per altra banda, es va canviar la conformació del mètode i es va realitzar l'assaig de luminescència per provar la interacció entre GLT1 i MLC1 i per provar la interacció entre NBC i MLC1. En el primer cas, es va utilitzar la homo-oligomerització de GLT-1 com a control positiu del mètode per validar la interacció GLT-1-MLC1. En aquesta conformació la interacció GLT-1-MLC1 va registrar uns nivells d'inducció de senyal molt més alts i per tant també es van obtenir diferències més significatives respecte el control negatiu (**Figura 49 B**). En el segon cas, es va utilitzar la homo-oligomerització de NBC com a control positiu d'interacció per validar la possible interacció entre NBC i MLC1. Tot i que els nivells d'inducció de senyal eren inferiors, també es van obtenir resultats significativament estadístics que mostraven la interacció directa entre NBC i MLC1 (**Figura 49 C**).

Per tant, els assajos d'interacció per Split-TEV validaven la interacció directa *in vitro* entre MLC1 i els candidats GLT-1 i NBC i així també es confirmaven els resultats obtinguts en la proteòmica que apuntaven que tant GLT-1 com NBC podien ser uns bons candidats a formar part de l'interactoma de MLC1.

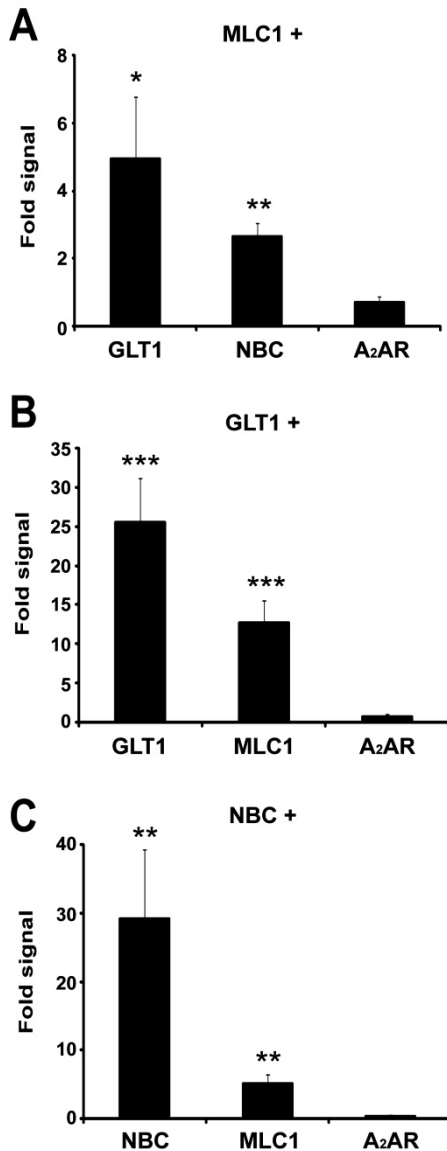


Figura 49. Validació de la interacció entre MLC1 i GLT-1 i de la interacció entre MLC1 i NBC per Split-TEV. A. Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar la interacció entre MLC1 i els dos candidats amb la conformació de MLC1-GLT-1 i MLC1-NBC. S'utilitza com a control negatiu la no interacció entre MLC1 i A₂AR. Dades corresponents a 4-6 experiments independents. B. Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar la interacció entre MLC1 i GLT-1 amb la conformació GLT-1-MLC1. S'utilitza com a control negatiu la no interacció entre GLT-1 i A₂AR. Dades corresponents a 5-8 experiments independents. C. Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar la interacció entre MLC1 i NBC amb la conformació NBC-MLC1. S'utilitza com a control negatiu la no interacció entre NBC i A₂AR. Dades corresponents a 3-5 experiments independents. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 respecte la senyal d'inducció obtinguda amb A₂AR; t-student no aparellada.

3.3. Validació de GlialCAM i identificació com a segon gen de malaltia.

Paral·lelament als estudis mostrats en aquesta Tesi, els estudis portats a terme per la Dra. Tania López amb el grup de proteïnes candidates típiques d'unions cel·lulars van erigir GlialCAM (o HepaCAM) com a principal proteïna d'interacció amb MLC1.

GlialCAM va mostrar un alt percentatge de colocalització amb MLC1 en l'expressió als cultius d'astròcits primaris de rata, trobant-se fortament enriquits en els contactes entre cèl·lules i en els processos astrocitaris (**Figura 50**).

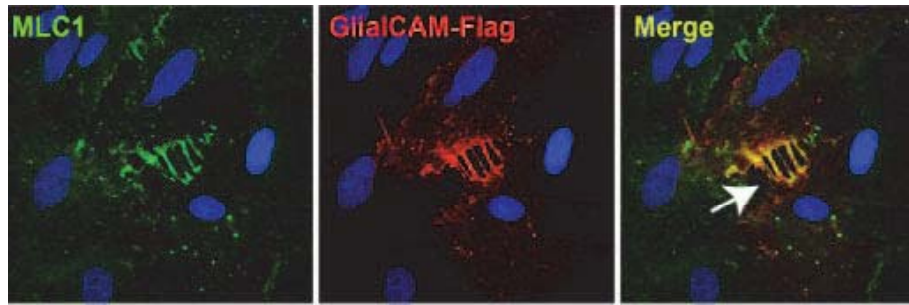


Figura 50. Colocalització de GlialCAM amb MLC1 en astròcits primaris de rata. Cultius d'astròcits primaris de rata aturats en el cicle cel·lular durant 3 setmanes amb Ara-C, transfectats amb la construcció de GlialCAM-Flag i estudiats per immunofluorescència. Es mostra la marca de MLC1 (en verd) utilitzant un anticòs contra la part N-terminal de la proteïna de ratolí, i la marca de GlialCAM (en vermell) utilitzant l'anticòs comercial contra Flag. La colocalització es mostra en la superposició de les dues imatges (merge, en groc). Imatge extreta de la Tesi de la Dra. Tania López.

Per altra banda, es va validar la interacció directa *in vitro* entre GlialCAM i MLC1 mitjançant el mètode de complementació proteica Split-TEV amb les dues conformacions possibles (**Figura 51**) (Capdevila-Nortes et al., 2012). Tot i que la senyal d'inducció obtinguda era menor que l'observada en la interacció entre MLC1 i GLT-1 o NBC, també es van observar diferències significatives respecte el control negatiu amb les dues conformacions d'implementació del mètode. En aquest cas, es va utilitzar de control negatiu l'antigen de superfície 4F2hc ja que és una proteïna de topologia semblant a GlialCAM amb un sol pas transmembrana.

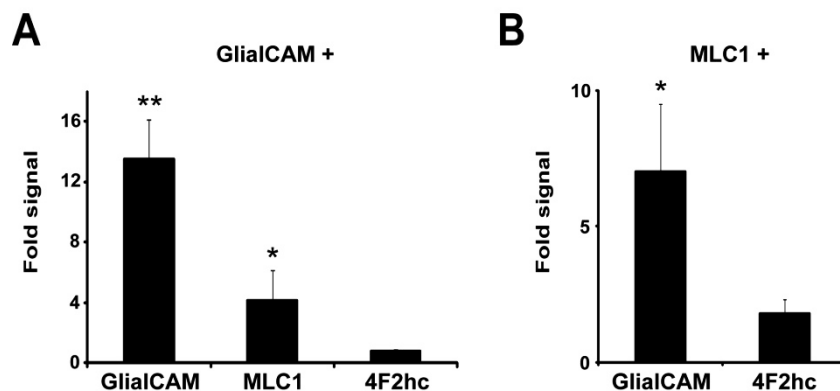


Figura 51. Validació de la interacció entre MLC1 i GlialCAM per Split-TEV. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en la conformació GlialCAM-MLC1. S'utilitza com a control negatiu la no interacció entre GlialCAM i 4F2hc. Dades corresponents a 10 experiments independents. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en la conformació MLC1-GlialCAM. S'utilitza com a control negatiu la no interacció entre MLC1 i 4F2hc. Dades corresponents a 15 experiments independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecte la senyal d'inducció obtinguda amb 4F2hc; t-student no aparellada.

Posteriorment a aquests estudis, l'empresa *Logopharm* va millorar el *software* i els mètodes d'anàlisi i es va poder desenvolupar un estudi de correlació quantitativa proteòmica. Així es va corroborar que GlialCAM era la segona proteïna més abundant que co-purificava específicament amb MLC1 utilitzant els diferents anticossos contra MLC1 (**Figura 52**).

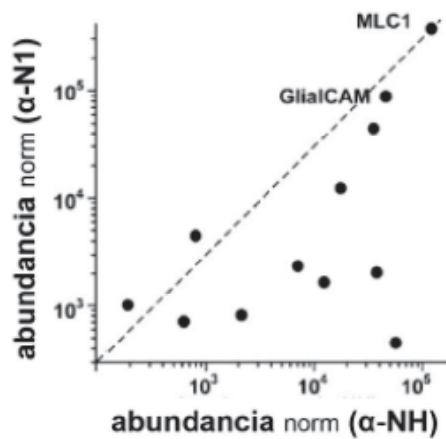


Figura 52. Avaluació de les diferents purificacions per afinitat amb els anticossos contra MLC1 realitzades per Logopharm. Gràfic 2D de les diferents abundàncies de proteïnes determinades per espectrometria de masses després d'haver coimmunoprecipitat membranes de cervell de rata i ratolí utilitzant dos anticossos diferents contra MLC1 (N1 i NH) (López-Hernández et al., 2011a).

Paral·lelament a tots aquests estudis bioquímics amb els candidats, es va començar la col·laboració amb el grup d'investigació de la Dra. Marjo van der Knaap de la Universitat d'Amsterdam, el qual va realitzar un estudi genètic a pacients amb MLC buscant mutacions en alguns dels gens de les proteïnes candidates que s'havien estudiat al nostre grup.

Es van analitzar 40 pacients provinents de 34 famílies diferents, que formaven part del 25% dels pacients que no presentaven mutacions en *MLC1* ni lligaven amb el seu locus i es van trobar 10 mutacions diferents en *GLIALCAM*. Per tant, mitjançant estudis de proteòmica, bioquímics i genètics es va poder identificar *GLIALCAM* com a segon gen de malaltia per MLC (López-Hernández et al., 2011a).

4. DISCUSSIÓ.

La recerca de proteïnes que poden formar part de l'interactoma de MLC1 és una bona aproximació per entendre quin paper fisiològic ocupa la proteïna dins la cèl·lula i per intentar identificar el mecanisme fisiopatològic de la malaltia MLC.

Utilitzant aproximacions genètiques i proteòmiques s'ha obtingut un llistat de possibles proteïnes candidates a formar part de la xarxa proteica que envolta MLC1. De totes aquestes proteïnes, s'han estudiat quatre candidats relacionats amb el transport d'ions a través de la membrana cel·lular, utilitzant assajos bioquímics *in vitro* i de colocalització amb MLC1 en cultius primaris d'astròcits de rata per validar la interacció obtinguda en els assajos de proteòmica. Aquesta validació d'interacció ha identificat al receptor de glutamat GLT-1 i al cotransportador de sodi-bicarbonat NBC com a possibles candidats més favorables a formar part de l'interactoma de MLC1.

La descripció de GlialCAM com a segon gen de malaltia, ha fet que el grup es centrés en l'estudi d'aquesta proteïna per intentar avançar en el coneixement de la fisiopatologia de MLC. Aquest fet, ha aturat el projecte per acabar de relacionar les proteïnes candidates amb MLC1 i identificar si realment GLT-1 i NBC formen part de l'interactoma de MLC1 o són falsos positius.

Per estar més segurs dels candidats obtinguts, es podrien repetir els estudis de proteòmica utilitzant teixit del ratolí *knock-out* de MLC1 com a control. La utilització del *knock-out* de MLC1 com a control negatiu permetria identificar les possibles inespecificitats provocades pels anticossos contra MLC1, que mostren certes inespecificitats a l'hora de detectar la proteïna en alguns tipus cel·lulars com per exemple neurones.

De totes maneres, els estudis d'interacció bioquímica mostren una interacció directa entre MLC1 i GLT-1 o NBC *in vitro*, que fa necessària la continuació del projecte amb altres tipus d'estudis. Es podrien realitzar estudis de coimmunoprecipitació reversa en teixit, coimmunoprecipitant GLT-1 o NBC i immunodetectant MLC1 per validar la interacció per proteòmica. Per altra banda, es podria observar si hi ha canvis en l'expressió o la localització d'aquests dos candidats en els ratolins *knock-out* de MLC1 i GlialCAM. Actualment el grup compta amb el ratolí *knock-out* de MLC1 i els estudis realitzats fins al moment no mostren cap canvi ni en l'expressió ni en la localització de GLT-1 en el teixit d'aquest ratolí. Finalment, s'haurien de portar a terme estudis de coexpressió funcional per observar si la sobreexpressió o la manca de MLC1 afecta d'alguna manera les funcions de recaptació de glutamat per part de GLT-1 o de recaptació de sodi i bicarbonat per part de NBC als astròcits en cultiu. Això es podria fer mitjançant assajos amb radioactivitat en cultius astrocitaris de ratolins *wild type* i *knock-down* de MLC1.

Algunes de les característiques fenotípiques de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals són el deteriorament de les funcions motores, atàxia cerebelar, dificultats en el llenguatge i retard mental. A més a més, els estudis de neuroimatge dels pacients mostren un encèfal atrofiat amb la substància blanca anormalment difusa que són símptomes de degeneració neuronal. (Van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b; Singhal et al., 1996; Topcu et al., 1998).

No es coneix la funció de MLC1, però una hipòtesi podria ser l'existència d'un macrocomplex proteic astrocitari involucrat en l'homeòstasi dels fluids o ions de l'espai

extracel·lular. Dins d'aquest macrocomplex, MLC1 podria actuar com a sensor de les condicions cel·lulars i extracel·lulars i activar una sèrie de vies de senyalització o una sèrie de proteïnes efectores. Per una banda, podria regular l'activació de proteïnes relacionades amb el control del volum cel·lular i el mecanisme de RVD (Ridder et al., 2011). Per altra banda, podria estar regulant una sèrie de proteïnes efectores per mantenir la correcta concentració d'ions a l'espai extracel·lular i aconseguir un bon funcionament neuronal. Algunes d'aquestes proteïnes efectores podrien ser GLT-1 o NBC. Finalment, GlialCAM podria ser la que regulés la localització de MLC1 als diferents espais subcel·lulars segons el moment ja que actua com a subunitat β (López-Hernández et al., 2011b).

En conclusió, GLT-1 i NBC podrien formar part de l'interactoma de MLC1 ja que s'ha validat per diferents metodologies una interacció directa i colocalitzen parcialment en cultius primaris d'astròcits. No obstant, són necessaris més tipus d'estudis per acabar de confirmar aquesta relació dels candidats amb MLC1 i poder avançar en el coneixement de la funció concreta de MLC1 la qual no ha pogut ser identificada.

Tot i que no s'ha identificat la funció de MLC1, l'estudi de les proteïnes que formen part de l'interactoma d'aquesta proteïna ha aportat dades fonamentals per la identificació de *GLIALCAM* com a segon gen de la malaltia MLC.

CAPÍTOL 3

Caracterització i desenvolupament de models cel·lulars per a l'estudi de MLC1 i GlialCAM a nivell bioquímic i funcional.

1. INTRODUCCIÓ.

Per poder avançar en el coneixement de la fisiopatologia de MLC, es van desenvolupar i caracteritzar models cel·lulars basats en el cultiu d'astròcits primaris de rata. Aquests cultius es van utilitzar per desenvolupar els models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM.

En aquest apartat de la Tesi es descriu la caracterització funcional del model *knock-down* de MLC1 i el desenvolupament i caracterització del model *knock-down* de GlialCAM. També, es presenten estudis de complementació dels dos models. Les complementacions s'han realitzat amb la sobreexpressió de MLC1, GlialCAM i CIC-2, i amb algunes variants mutants de MLC1 i GlialCAM. Aquests models de complementació permeten estudiar l'efecte que provoquen les proteïnes sobreexpressades en un model cel·lular sense la proteïna endògena.

Amb la generació d'aquests models *in vitro* es pretén avançar en el coneixement de la bioquímica i la funció tant de MLC1 com de GlialCAM.

1.1. Caracterització del model primari d'astròcits de rata.

Anteriorment en el grup, la Dra. Anna Duarri va desenvolupar el model cel·lular astrocitari a partir d'un cultiu d'astròcits de còrtex i hipocamp de rata. Els primers estudis mostraven que els nivells d'expressió de MLC1 en aquests astròcits augmentaven amb el temps de cultiu i la proteïna presentava una localització citoplasmàtica, contràriament a la localització a la membrana plasmàtica descrita *in vivo* (Teijido et al., 2004).

Amb aquest resultat es va contemplar la possibilitat que l'expressió i la localització de MLC1 depenguessin de l'estat de quiescència o de diferenciació cel·lular. Per això, es van utilitzar diferents agents químics que induïen la parada de cicle a la fase G0/G1 com la cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) o la Uridina/Fluoridina. Utilitzant Ara-C i mantenint els cultius en parada de cicle durant 3 setmanes es va observar que els astròcits adoptaven una morfologia molt característica de cèl·lules estrellades i planes, on s'observaven processos que connectaven les diferents cèl·lules del cultiu. MLC1 augmentava l'expressió amb el temps i a les 3 setmanes mostrava una clara localització a la membrana plasmàtica i en aquests processos de contactes astrocitaris (Duarri et al., 2011). En aquest model cel·lular *in vitro*, la proteïna MLC1 estava localitzada en unions cel·lulars igual que s'observava *in vivo* (Teijido et al., 2004).

Es van caracteritzar aquests processos de contacte entre astròcits mitjançant immunocitoquímica de diferents proteïnes típiques d'unions cel·lulars. MLC1 presentava cert grau de colocalització amb ZO-1 i Occludin (unions *tight*), amb β -Catenin i N-Cadherin (unions *adherent*) i parcialment amb Connexin-43 (unions *gap*). Per altra banda, no colocalitzava amb Vinculin i Paxillin (*focal adhesion*), amb Erzin (filopòdia) ni amb Plectin (hemidesmosomes). Per tant, aquests processos de contacte entre astròcits on es localitzava MLC1 van ser identificats com a unions complexes formades per proteïnes típiques d'unions *tight*, *adherent* i *gap* (Duarri et al., 2011).

En aquest model primari d'astròcits de rata, GlialCAM s'expressa endògenament i es localitza a la membrana plasmàtica i més concretament, es concentra en els processos de connexió entre astròcits. Les característiques funcionals de GlialCAM com a subunitat β de MLC1 també s'observen en aquest model ja que és capaç de dirigir MLC1 a unions cel·lulars i les mutacions trobades a GlialCAM provoquen un defecte de localització de les dues proteïnes (López-Hernández et al., 2011a).

2. GENERACIÓ DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

Per obtenir els models *knock-down* es va utilitzar la tecnologia dels microRNAs (miRNAs) i els adenovirus com a vector d'introducció dels miRNAs a les cèl·lules del model astrocitari. Es va escollir aquesta tecnologia perquè el model astrocitari presentava uns nivells de transfecció molt baixos, al voltant del 20%, que eren del tot insuficients per generar un model *knock-down*.

Es van dissenyar miRNAs contra diferents regions del RNA missatger (mRNA) de MLC1 i GlialCAM. A més a més, es va utilitzar un miRNA que no és complementari a cap regió del mRNA (miRNA SCR), com a control d'infecció per adenovirus. Tots els miRNAs generats van ser construïts en un vector que expressava la proteïna esmeralda GFP (emGFP), així es va aconseguir tenir un seguiment efectiu de les cèl·lules que incorporaven el virus.

Les construccions es van realitzar mitjançant la metodologia *Gateway* (Invitrogen), i els adenovirus es van produir mitjançant la transfecció de cèl·lules HEK 293A.

2.1. Desenvolupament del model *knock-down* de MLC1.

El model *knock-down* de MLC1 va ser posat apunt per la Dra. Anna Duarri. Es van generar adenovirus que expressaven dos miRNAs diferents contra diferents regions del RNA missatger de MLC1 (miRNA 756 i miRNA 905).

Utilitzant les tècniques de WB, RT-PCR i immunofluorescència es va fer un estudi de dosi resposta a diferents MOIs i diferents temps on es va observar que s'aconseguia una eliminació total de l'expressió de MLC1 en infectar el cultiu amb els miRNAs a MOI 5 i esperant 5-7 dies a que fessin l'efecte (Duarri et al., 2011). A més a més, es va complementar el model *knock-down* amb un adenovirus que expressa la proteïna MLC1 humana que conté un epítip HA. Aquests experiments van mostrar que els miRNAs contra la proteïna de rata no afectaven la correcte expressió i localització de MLC1 humana (**Figura 53**) (Duarri et al., 2011).

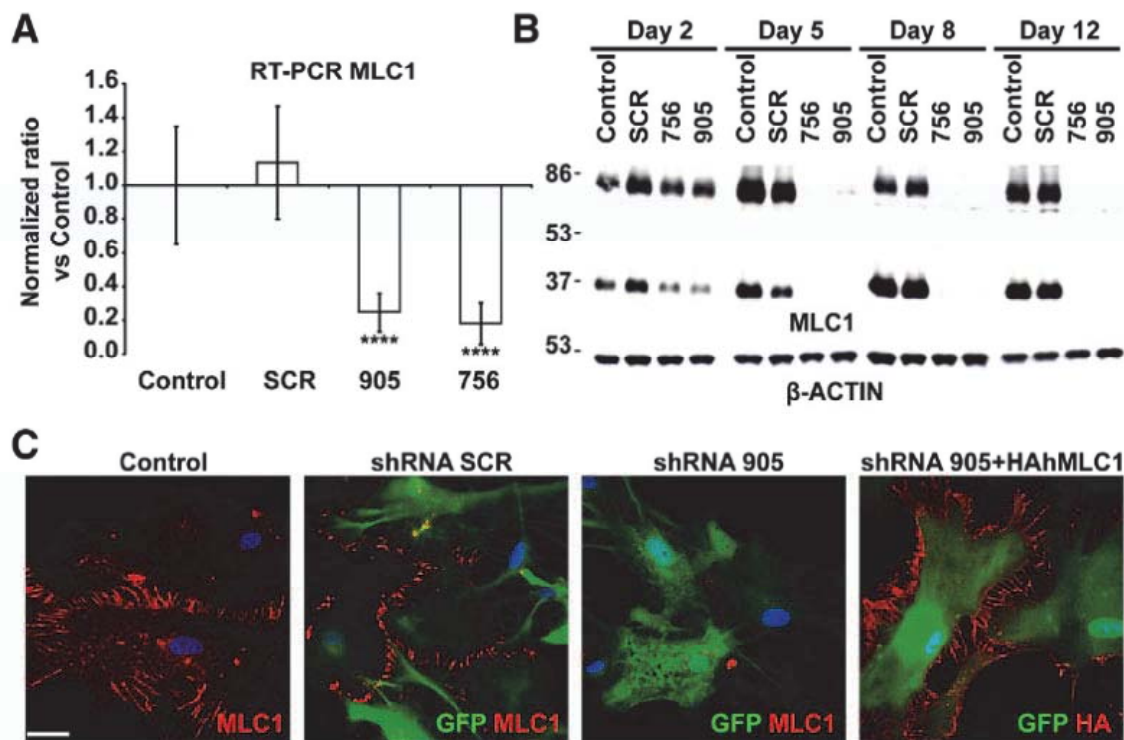


Figura 53. Desenvolupament del model *knock-down* de MLC1 mitjançant miRNA en cultius primaris d'astròcits de rata. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 905 o miRNA 756 a MOI 5 durant 5 dies, analitzats per RT-PCR. Es mostra els nivells de canvi d'expressió de mRNA respecte el miRNA SCR. Dades corresponents a 4 experiments independents. **** $p < 0.0005$; anàlisi amb BootstRatio. **B.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 756 o miRNA 905 a MOI 5 durant 2, 5, 8 i 12 dies, analitzats per WB. S'utilitza β-Actin com a control de càrrega. Experiment representatiu de 10 experiments independents. **C.** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 905 o miRNA 756 a MOI 5 durant 7 dies o infectats amb miRNA 905 a MOI 5 durant 7 dies i HAML1C1 a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 endògena o sobreexpressada (en vermell) utilitzant un anticòs contra la part C-terminal o un anticòs comercial contra HA. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 μm. Imatge estreta de (Duarri et al., 2011).

Per facilitar la comprensió dels estudis de caracterització del model realitzats en aquesta Tesi, s'anomenarà el miRNA 905 com a miRNA MLC1₁ i el miRNA 756 com a miRNA MLC1₂.

2.2. Desenvolupament del model *knock-down* de GlialCAM.

Es van construir miRNAs contra quatre regions diferents del mRNA de GlialCAM (miRNA 523, miRNA 845, miRNA 908 i miRNA 1392). En la fase de producció dels adenovirus corresponents es va descartar el miRNA 845 ja que no es va aconseguir produir l'adenovirus.

Utilitzant la tècnica de WB, es va fer un estudi de dosi resposta de la infecció a diferents MOIs i a diferents temps d'infecció per cada determinada MOI (**Figura 54**).

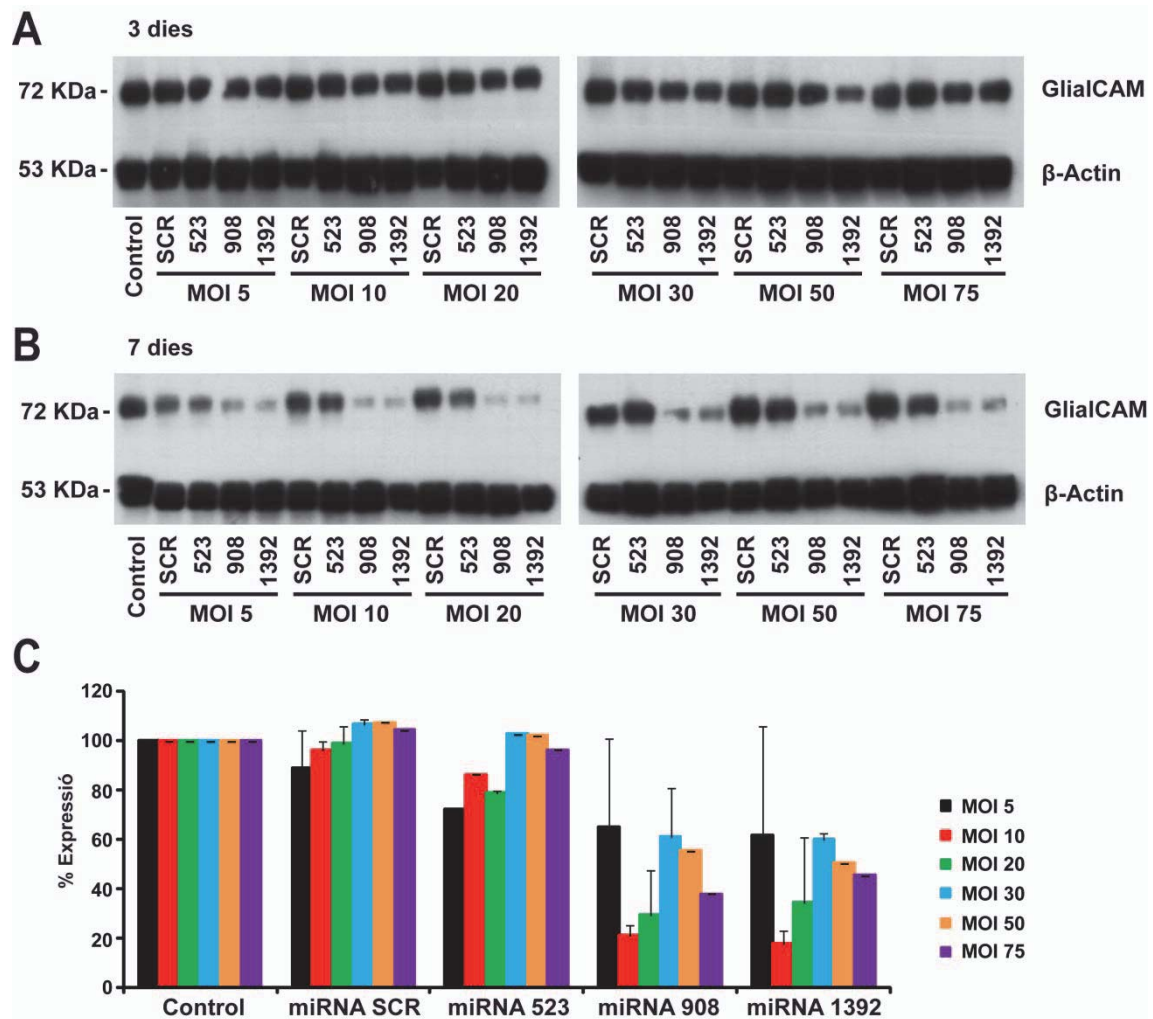


Figura 54. Anàlisi de la reducció de l'expressió de GlialCAM en cultius primaris d'astròcits de rata, utilitzant els miRNAs. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats durant 3 dies amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 523, miRNA 908 o miRNA 1392 a diferents MOI, analitzats per WB. **B.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats durant 7 dies amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 523, miRNA 908 o miRNA 1392 a diferents MOI, analitzats per WB. **C.** Quantificació dels nivells d'expressió de GlialCAM en els grups especificats a B. Es relativitza al 100% d'expressió, l'expressió en astròcits control. S'utilitza β -Actin com a control de càrrega. Dades corresponent a 1-11 experiments independents.

Es va comparar l'expressió de GlialCAM en astròcits sense infectar (control) respecte a astròcits infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 523, miRNA 908 o miRNA 1392. Les infeccions es van realitzar a MOI 5, MOI 10, MOI 20, MOI 50 i MOI 75 ja que les proves prèvies utilitzant MOIs més petites van mostrar que GlialCAM era una proteïna molt estable. Totes aquestes condicions d'infecció es van mantenir durant 3 dies (**Figura 54 A**) o durant 7 dies (**Figura 54 B**) en els cultius cel·lulars.

L'expressió de GlialCAM no es veia afectada amb la infecció dels miRNAs a qualsevol MOI durant 3 dies (**Figura 54 A**). En canvi, quan es mantenia els miRNAs durant 7 dies si que es va observar un efecte en els nivells d'expressió de GlialCAM (**Figura 54 B i C**). Tal i com s'esperava, l'expressió de la proteïna no es veia afectada amb la infecció del miRNA SCR. El miRNA 523 tampoc produïa una caiguda de l'expressió de GlialCAM en cap de les condicions estudiades. En canvi, els miRNAs 908 i 1392 provocaven una caiguda considerable dels nivells d'expressió.

Ja que la infecció s'havia de produir durant 7 dies i es volien restringir al màxim els efectes tòxics de la infecció per virus, es va escollir la mínima MOI que causés el màxim de caiguda de l'expressió per treballar. Aquestes condicions van ser la utilització del miRNA 908 i el miRNA 1392 a MOI 10 durant 7 dies.

Amb aquestes condicions es va caracteritzar el model *knock-down* de GlialCAM mitjançant WB, RT-PCR i immunofluorescència (**Figura 55**).

Per WB es va poder observar i quantificar una caiguda del 80% dels nivells de proteïna. Aquesta disminució era estadísticament significativa respecte el miRNA SCR o els astròcits control (**Figura 55 A**). Per altra banda, es va voler comprovar per RT-PCR si els miRNAs disminuïen els nivells de RNA missatger (mRNA). Aquests estudis es van fer en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Virginia Nunes (UB-IDIBELL). La RT-PCR va mostrar que disminuïen els nivells d'expressió del RNA missatger de GlialCAM significativament amb els miRNAs respecte el miRNA SCR (**Figura 55 B**). Finalment, per immunofluorescència també es va observar que amb l'efecte dels miRNAs 908 i 1392 es perdia l'expressió proteica de GlialCAM en els cultius astrocitaris (**Figura 55 C**).

Aquestes evidències a nivell de RNA missatger i a nivell d'expressió i localització proteica, van demostrar que s'havia aconseguit generar un model *knock-down* de GlialCAM en cultius primaris d'astròcits de rata.

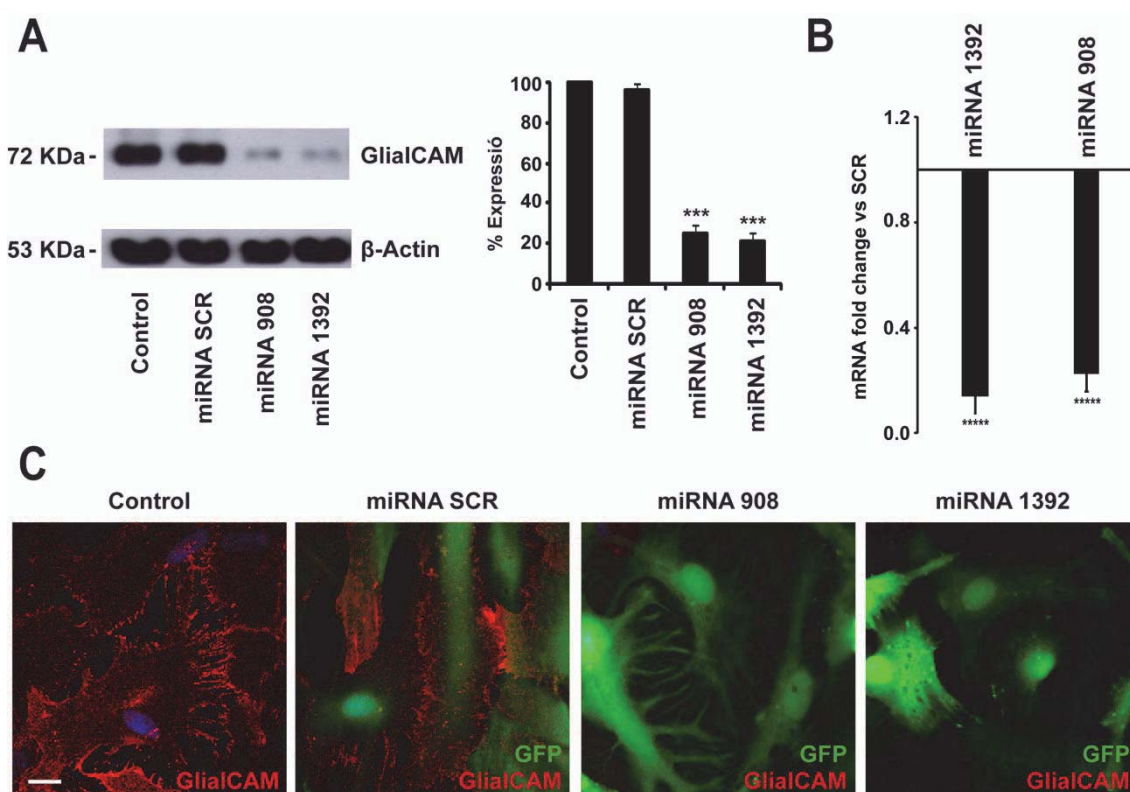


Figura 55. Caracterització del model *knock-down* de GlialCAM en cultius primaris d'astròcits de rata, utilitzant els miRNAs. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 908 o miRNA 1392 a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per WB. Es mostra la quantificació de l'expressió relativitzada respecte l'expressió en astròcits control. S'utilitza β -Actin com a control de càrrega. Dades corresponents a 14 experiments independents. *** $p < 0.001$ respecte miRNA SCR; t-student no aparellada. **B.** Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 908 o miRNA 1392 a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per RT-PCR. Es mostra els nivells de canvi d'expressió de mRNA respecte el miRNA SCR. Dades corresponents a 4 experiments independents. **** $p < 0.0005$; anàlisi amb BootstRatio. **C.** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 908 o miRNA 1392 a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta GlialCAM endògena (en vermell) utilitzant un anticòs contra la part C-terminal. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 μ m.

Per facilitar la comprensió dels estudis de caracterització del model realitzats en aquesta Tesi, s'anomenarà el miRNA 1392 com a miRNA GlialCAM₁ i el miRNA 908 com a miRNA GlialCAM₂.

3. CARACTERITZACIÓ DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

Un cop es van haver generat els model cel·lulars, es va estudiar l'expressió i la localització de MLC1, GlialCAM i CIC-2 en aquests models, com a proteïnes importants per l'estudi de les funcions de MLC1 i GlialCAM. Per altra banda, es van estudiar altres proteïnes relacionades amb les unions i amb el transport com a marcadors astrocitaris.

3.1. Estudi de MLC1, GlialCAM i CIC-2 en els models *knock-down*.

Mitjançant WB i immunofluorescència es va realitzar l'estudi de l'expressió i la localització de GlialCAM i CIC-2 en el model *knock-down* de MLC1 (**Figura 56**). L'absència de MLC1 endògena no provocava canvis en l'expressió de GlialCAM o CIC-2 (**Figura 56 A**). Tampoc es va observar cap canvi en la localització ja que GlialCAM es localitzava als contactes astrocitaris mentre que CIC-2 presentava una marca retinguda intracel·lularment igual que en astròcits infectats amb miRNA SCR (**Figura 56 B**). Aquesta marca de CIC-2 és la que s'obté amb l'anticòs disponible contra aquesta proteïna en el model cel·lular astrocitar. La detecció majoritària de la proteïna retinguda al reticle endoplasmàtic al voltant del nucli s'ha observat en astròcits sense infectar i és específica de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012).

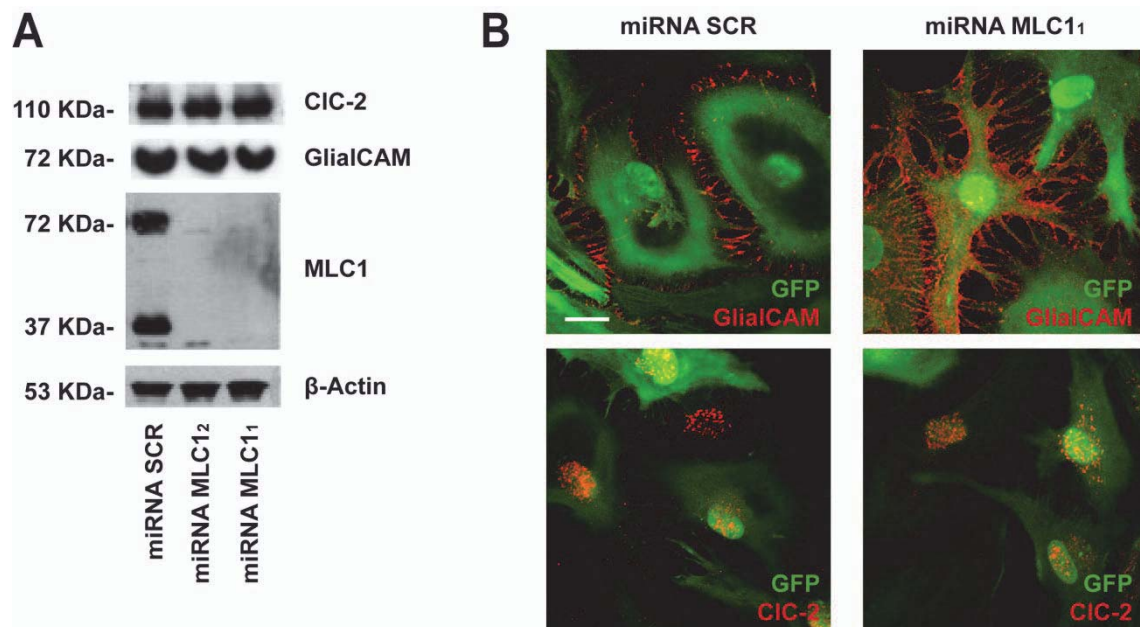


Figura 56. Estudi de GlialCAM i CIC-2 en el model *knock-down* de MLC1. **A.** Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA MLC1₁ o miRNA MLC1₂ a MOI 5 durant 5 dies, analitzats per WB. S'utilitza β -Actin com a control de càrrega. **B.** Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA MLC1₁ a MOI 5 durant 5 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta GlialCAM o CIC-2 endògenes (en vermell) utilitzant anticossos contra la part C-terminal. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 μ m.

Per altra banda, es va realitzar l'estudi de l'expressió i la localització de MLC1 i CIC-2 en el model *knock-down* de GlialCAM. En aquest cas, es van realitzar assajos de WB, immunofluorescència i RT-PCR en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Virginia Nunes (**Figura 57**).

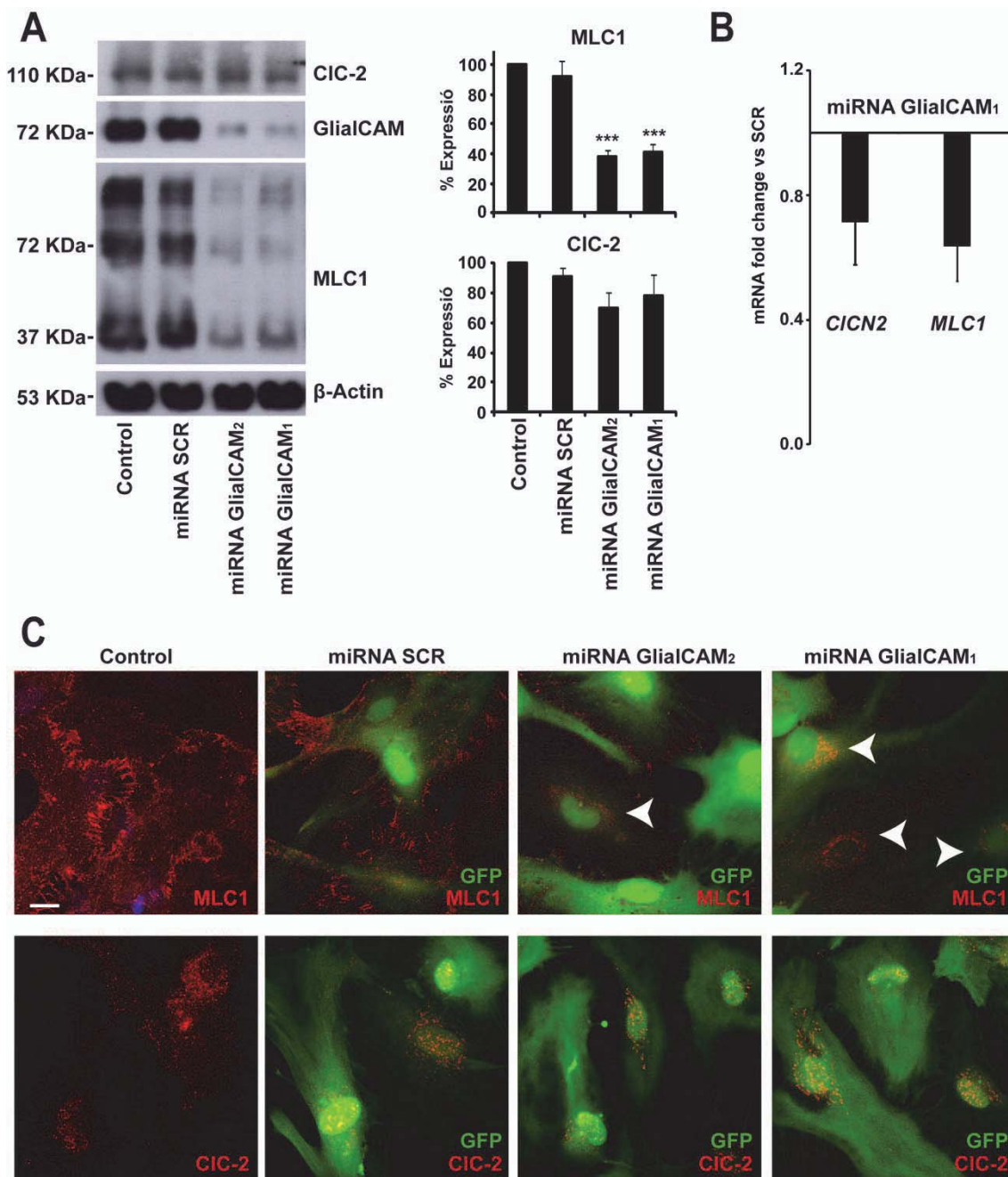


Figura 57. Estudi de MLC1 i CIC-2 en el model knock-down de GlialCAM. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM₂ o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per WB. Es mostra la quantificació de l'expressió relativitzada respecte l'expressió en astròcits control. S'utilitza β-Actin com a control de càrrega. Dades corresponents als següents experiments independents: 14 (GlialCAM), 9 (MLC1) i 7 (CIC-2). *** p<0.001 respecte miRNA SCR; t-student no aparellada. **B.** Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per RT-PCR. Es mostra els nivells de canvi d'expressió de mRNA respecte el miRNA SCR. Dades corresponents a 4 experiments independents. **C.** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM₂ o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 o CIC-2 endògenes (en vermell) utilitzant un anticòs contra la part la part N-terminal (MLC1) o contra la part C-terminal (CIC-2). La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 μm.

No es van observar canvis ni en els nivells d'expressió de proteïna, ni en els nivells de mRNA de CIC-2 en absència de GlialCAM. Tampoc es va observar cap canvi en la

localització d'aquesta proteïna en comparació amb astròcits control o infectats amb miRNA SCR (**Figura 57**). En canvi, MLC1 no mostrava una disminució significativa dels nivells de RNA missatger però presentava una caiguda significativa dels nivells d'expressió de proteïna del 60% (**Figura 57 A i B**). A més a més, es va observar un gran canvi en la localització, ja que passava d'una localització de membrana i d'unions cel·lulars a una localització intracel·lular difusa i concentrada en el reticle endoplasmàtic en absència de GlialCAM (**Figura 57 C, fletxes**).

Aquestes dades introduïen la hipòtesi que GlialCAM era estrictament necessària per una correcta expressió i localització a les unions cel·lulars de MLC1. En canvi, GlialCAM no es veia afectada per la manca de MLC1. El canal CIC-2 no mostrava canvis en aquests models defectius de MLC1 o GlialCAM.

3.2. Estudi de marcadors proteics en els models *knock-down*.

Per acabar la caracterització dels models es va estudiar l'expressió i localització d'una sèrie de proteïnes relacionades amb les unions astrocitàries o amb el transport d'ions en els models *knock-down* generats (**Figura 58**).

Es van realitzar estudis de WB en el model *knock-down* de MLC1 i no es van observar canvis en l'expressió de cap tipus de proteïna marcador relacionada amb les unions cel·lulars com ZO-1 i Occludin, típiques d'unions *tight*, β -Catenin, proteïna característica d'unions *adherent* o Paxillin, típica de *focal adhesion*. Tampoc es van observar canvis en l'expressió del cotransportador de K^+ i Cl^- KCC1 (**Figura 58 A**).

El mateix tipus d'estudis es van realitzar en el model *knock-down* de GlialCAM on tampoc es van observar diferències en els nivells d'expressió de cap de les proteïnes estudiades. En aquest cas, es van analitzar les proteïnes típiques d'unions ZO-1, Occludin, β -Catenin i també Connexin 43 que és una proteïna característica de les unions tipus *gap* (**Figura 58 B**). Per altra banda, es va mirar la localització de β -Catenin i Connexin 43 i tampoc es va veure cap diferència respecte els astròcits control (**Figura 58 C**).

Per tant, els efectes observats en els models *knock-down* eren deguts a la manca de MLC1 o GlialCAM i no a efectes inespecífics dels miRNAs generats, ja que cap de les proteïnes marcadors estudiades presentaven canvis en la seva expressió i localització habitual en les cèl·lules del model.

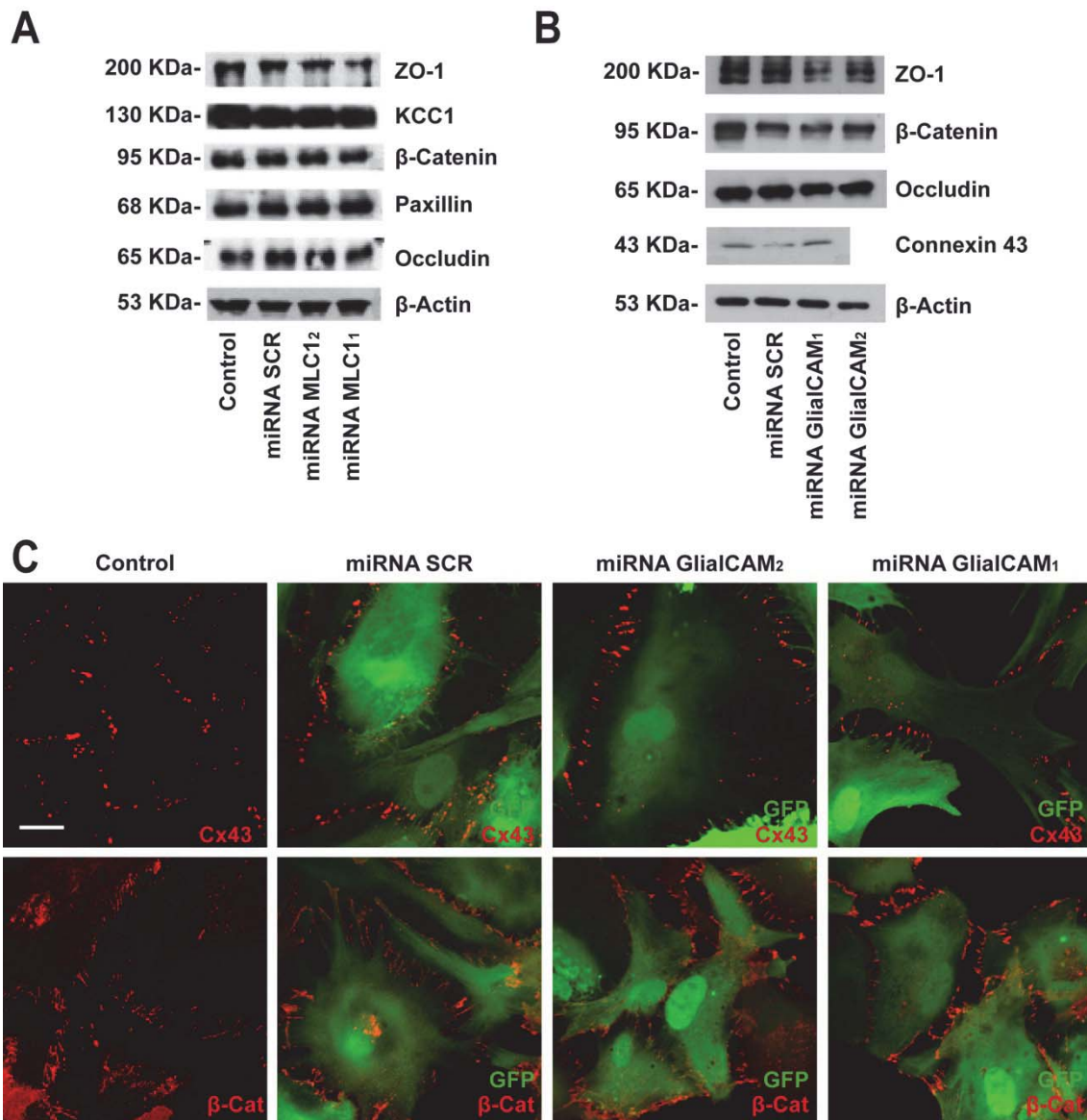


Figura 58. Estudi de marcadors proteics en els models *knock-down*. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA MLC12 o miRNA MLC11 a MOI 5 durant 5 dies, analitzats per WB. Es mostra un experiment representatiu de la marca obtinguda amb anticossos específics contra les proteïnes indicades. S'utilitza β-Actin com a control de càrrega. Dades corresponents a 3 experiments independents. **B.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM1 o miRNA GlialCAM2 a MOI 10 durant 7 dies, analitzats per WB. Es mostra un experiment representatiu de la marca obtinguda amb anticossos específics contra les proteïnes indicades. Connexin 43 no s'ha pogut validar en astròcits infectats amb miRNA GlialCAM2. S'utilitza β-Actin com a control de càrrega. Dades corresponents a 3 experiments independents. **C.** Astròcits primaris de rata en les condicions anteriors del model *knock-down* de GlialCAM, analitzats per immunofluorescència. Es detecta Connexin 43 (Cx43) o β-Catenin (β-Cat) endògenes (en vermell) utilitzant anticossos comercials. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 μm.

4. COMPLEMENTACIÓ DELS MODELS ASTROCITARIS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

Per poder avançar en el coneixement de la bioquímica i la funció de MLC1 i GlialCAM i per estudiar els efectes de les mutacions en aquestes proteïnes, es van complementar els models *knock-down* generats amb la sobreexpressió de diferents proteïnes.

4.1. Caracterització de l'expressió i la localització de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM.

Primerament es va estudiar la complementació amb GlialCAM humana per comprovar que tots els efectes observats en el model *knock-down* fossin específics de la manca de GlialCAM.

En segon lloc, es va estudiar l'efecte d'algunes de les mutacions trobades a GlialCAM en pacients de MLC. Es va treballar amb la mutació dominant R92W i les mutacions recessives R92Q, S196Y i P148S. GlialCAM R92W i GlialCAM R92Q són exemples de mutacions que provoquen un defecte bioquímic en GlialCAM (López-Hernández et al., 2011b). Per altra banda, GlialCAM S196Y i GlialCAM P148S es comporten bioquímicament igual que la proteïna *wild type* per tant, l'estudi dels seus models de complementació podria ajudar a identificar quina deficiència provoquen aquestes mutacions.

Finalment, també es va complementar el model amb MLC1 i CIC-2 com a proteïnes relacionades amb GlialCAM (Jeworutzki et al., 2012; López-Hernández et al., 2011b).

Per poder realitzar aquestes sobreexpressions es van utilitzar adenovirus construïts anteriorment en el grup. Les proteïnes GlialCAM *wild type* humana i totes les variants mutants, tenen fusionats tres epítops Flag a l'extrem C-terminal. La proteïna CIC-2 de rata té fusionats 3 epítops Flag a l'extrem N-terminal. La proteïna MLC1 *wild type* humana conté un epítop HA. Les infeccions d'aquests adenovirus de sobreexpressió es van fer a MOI 2 i es van deixar 48 hores als cultius cel·lulars.

A nivell d'expressió proteica, es van analitzar els nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en totes les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM realitzades, mitjançant WB (**Figura 59**).

La sobreexpressió de GlialCAM humana escapava a l'efecte del miRNA contra la proteïna de rata, tal i com s'esperava, i generava un augment de l'expressió de GlialCAM en el model (**Figura 59 A i C**). Això també succeïa en sobreexpressar els mutants R92W i R92Q (**Figura 59 A i C**) i els mutants S196Y i P148S (**Figura 59 B i C**). En canvi, la sobreexpressió tant de MLC1 com de CIC-2 no provocaven canvis en l'expressió de GlialCAM endògena que continuava estant disminuïda per l'efecte del miRNA (**Figura 59 A i C**).

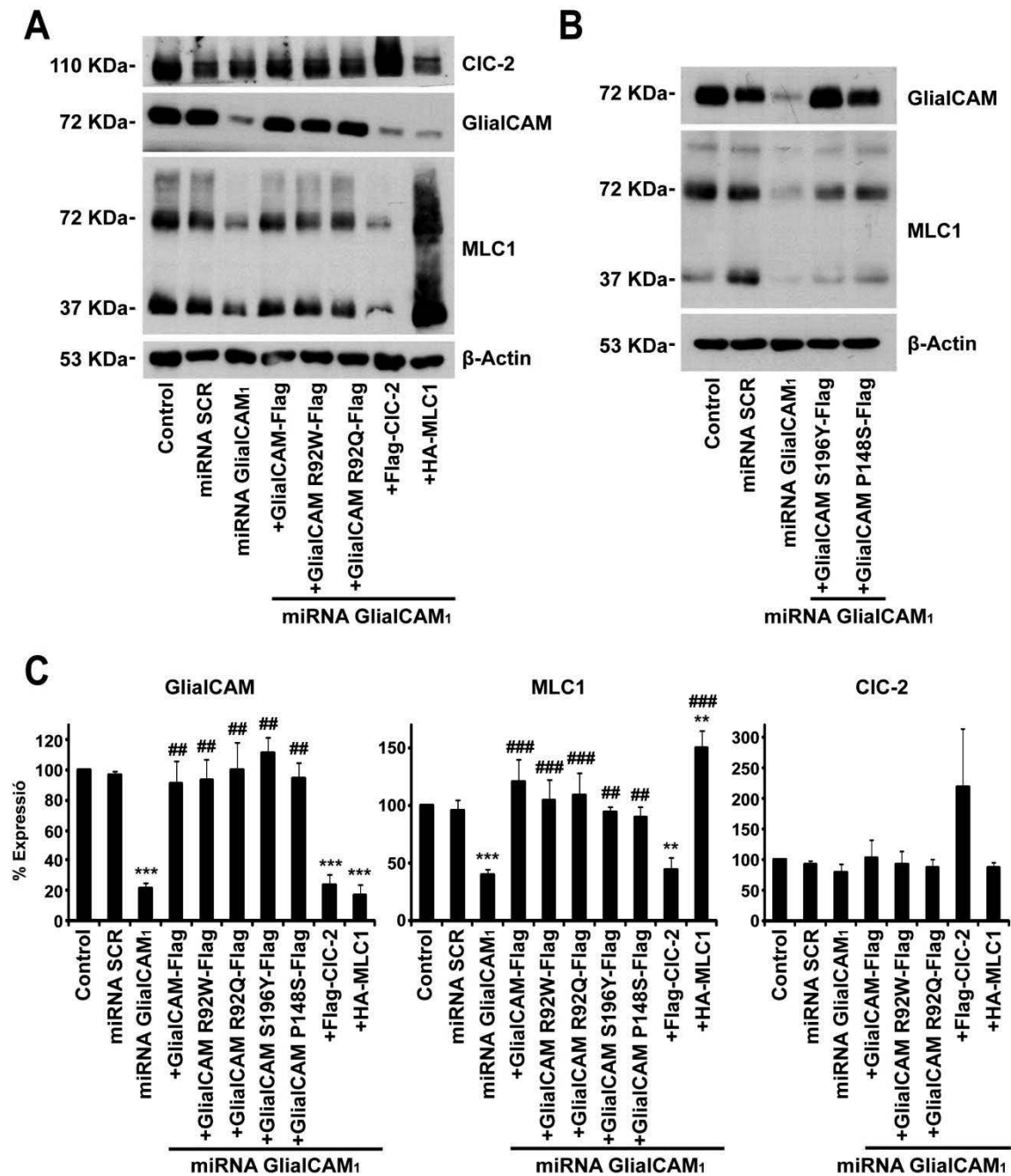


Figura 59. Caracterització dels nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en els models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM per miRNA GlialCAM₁. **A.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies complementat amb GlialCAM-Flag, GlialCAM R92W-Flag, GlialCAM R92Q-Flag, Flag-CIC-2 o HA-MLC1 infectats a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per WB. **B.** Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies complementat amb GlialCAM S196Y-Flag o GlialCAM P148S-Flag infectats a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per WB. **C.** Quantificació de l'expressió relativitzada respecte l'expressió en astròcits control. S'utilitza β -Actin com a control de càrrega. Dades corresponents als següents experiments independents: 5-14 (GlialCAM), 3-10 (MLC1) i 4-7 (CIC-2). ** p<0.01; *** p<0.001 respecte miRNA SCR; ## p<0.01; ### p<0.001 respecte miRNA GlialCAM₁; t-student no aparellada.

La disminució de l'expressió de MLC1 endògena en el model *knock-down* de GlialCAM era revertida amb la sobreexpressió de GlialCAM *wild type*, confirmant l'especificitat de

l'efecte observat. Sorprenentment, aquesta recuperació dels nivells d'expressió de MLC1 també s'observava amb la complementació amb tots els mutants de GlialCAM estudiats (**Figura 59**). Per altra banda, la manca de GlialCAM no impedia la sobreexpressió de MLC1 en el seu model de complementació, mentre que la sobreexpressió de CIC-2 no feia cap efecte sobre el miRNA i els nivells de MLC1 es mantenien disminuïts (**Figura 59 A i C**). No es van observar canvis en l'expressió de CIC-2 en cap model de complementació excepte en el de sobreexpressió de la pròpia proteïna (**Figura 59 A i C**).

Es van observar els mateixos efectes sobre els nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 amb les complementacions del model *knock-down* generat amb el miRNA GlialCAM₂ (**Figura 76 Annex**).

Prèviament als estudis de localització, es va voler comprovar que la infecció d'un miRNA no provocava canvis en la correcta localització ni de les proteïnes sobreexpressades, ni de MLC1 endògena. Es van realitzar immunofluorescències de cadascuna de les proteïnes sobreexpressades i de MLC1 endògena en astròcits infectats amb miRNA SCR i es va observar que totes les proteïnes estudiades mantenien la localització observada en astròcits control sense infectar (Duarri et al., 2011; Jeworutzki et al., 2012). Per altra banda, MLC1 endògena es localitzava correctament a totes les condicions estudiades (**Figura 77, Annex**).

Els estudis de complementació del model *knock-down* de GlialCAM van mostrar que la manca de GlialCAM no afectava la localització a la membrana o a les unions astrocitàries de GlialCAM *wild type*, ni de cap de les seves variants mutants (**Figura 60 A-E**). Tampoc variava la localització de CIC-2 retinguda al voltant del nucli (**Figura 60 G**), però la localització de MLC1 en ser sobreexpressat, sí que mostrava diferències respecte la localització habitual. Tot i que l'efecte de sobreexpressió feia localitzar part de MLC1 a la membrana, la manca de GlialCAM provocava una major retenció intracel·lular de la proteïna (**Figura 60 F, fletxes**).

Aquests resultats reforçaven la hipòtesi que GlialCAM era necessària per la correcta localització de MLC1.

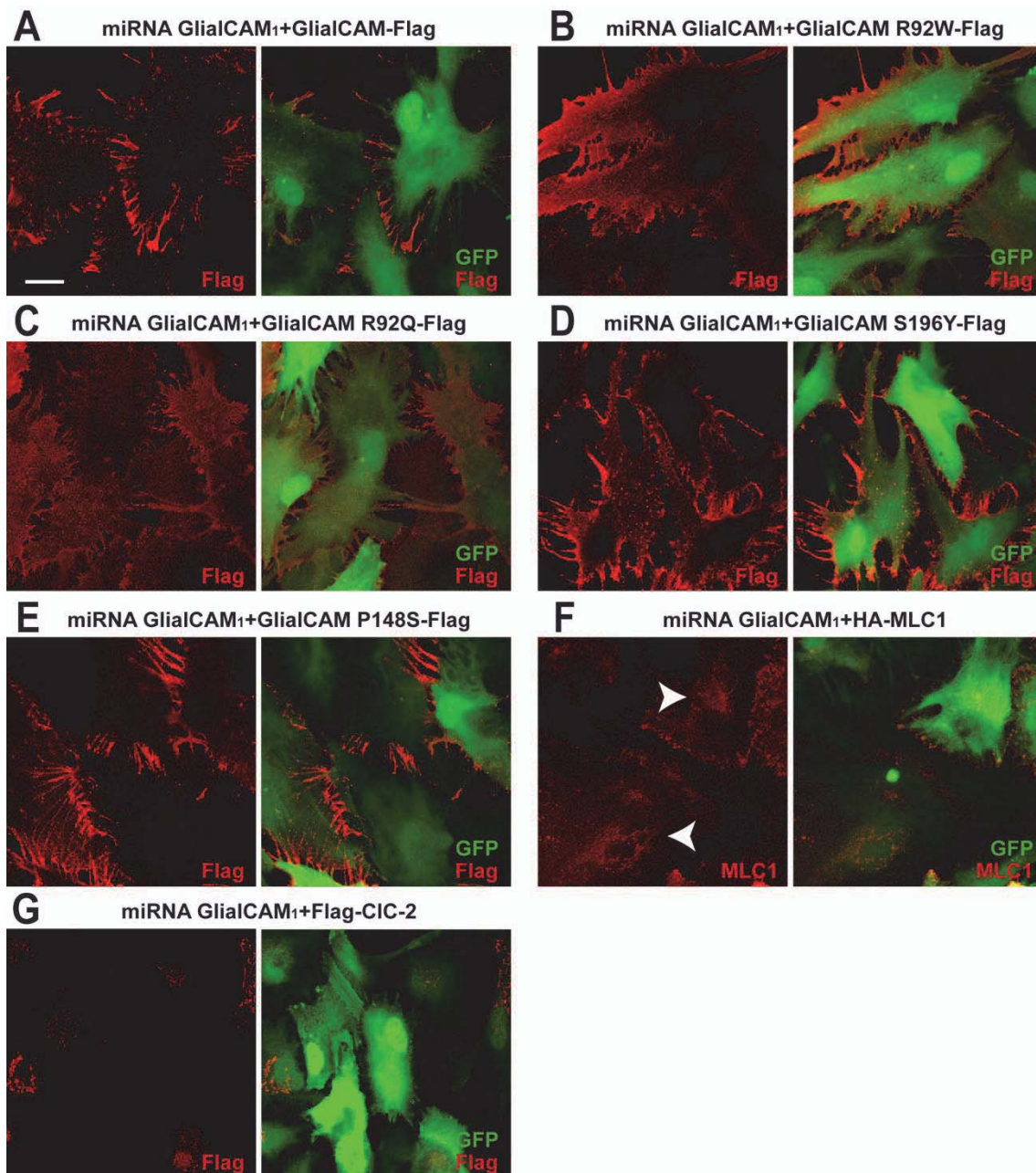


Figura 60. Estudi de la localització de les proteïnes sobreexpressades en les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies complementats amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (A), GlialCAM R92W-Flag (B), GlialCAM R92Q-Flag (C), GlialCAM S196Y-Flag (D), GlialCAM P148S-Flag (E), HA-MLC1 (F) o Flag-CIC-2 (G) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta cada proteïna sobreexpressada (en vermell) amb un anticòs comercial contra Flag o amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 humana segons el cas. Es mostra la marca obtinguda i el *merge* amb la senyal de GFP que identifica els astròcits que expressen el miRNA GlialCAM₁. Barra, 20 µm.

L'estudi de la localització de MLC1 endògena en les complementacions del model defectiu de GlialCAM (Figura 61) van mostrar que l'efecte observat en el model *knock-down* era específic, ja que la complementació del model amb GlialCAM humana recuperava la correcta localització de MLC1 en unions astrocitàries (Figura 61 A). Per altra banda, les mutacions S196Y i P148S també eren capaces de recuperar la correcta localització de MLC1 (Figura 61 D i E). En canvi, les mutacions R92W i R92Q

no eren capaces de localitzar MLC1 a les unions, mostrant-se difusa per tota la cèl·lula (Figura 61 B i C). Finalment, la sobreexpressió de CIC-2 no influïa en la deslocalització de MLC1 provocada per la manca de GlialCAM endògena (Figura 61 F).

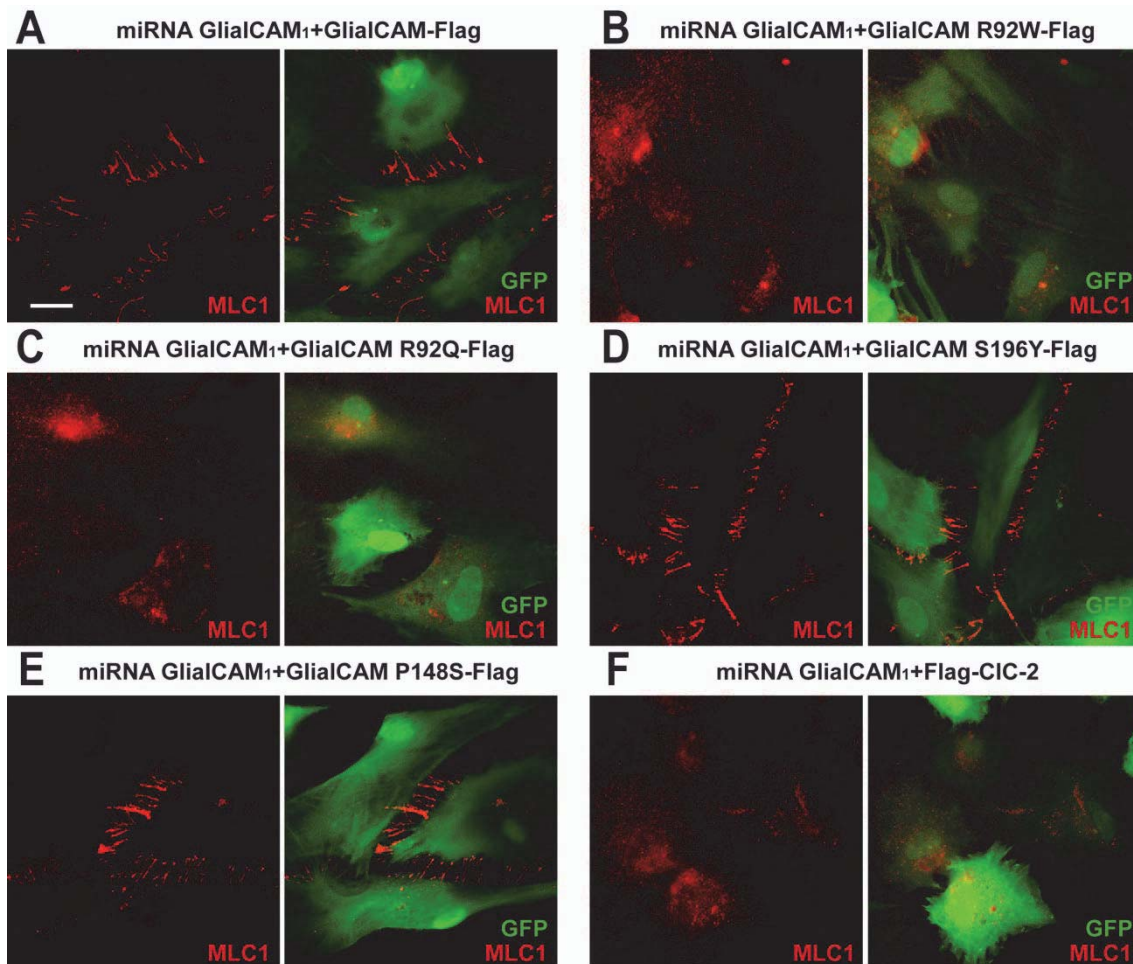


Figura 61. Estudi de la localització de MLC1 en astròcits dels models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies complementats amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (A), GlialCAM R92W-Flag (B), GlialCAM R92Q-Flag (C), GlialCAM S196Y-Flag (D), GlialCAM P148S-Flag (E) o Flag-CIC-2 (F) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 endògena (en vermell) amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 de ratolí. Es mostra la marca obtinguda i el *merge* amb la senyal de GFP que identifica els astròcits que expressen el miRNA GlialCAM₁. Barra, 20 µm.

La complementació del model *knock-down* generat amb el miRNA GlialCAM₂ va reproduir els mateixos resultats de localització de les proteïnes sobreexpressades i de MLC1 endògena (Figura 78, Annex).

4.2. Caracterització de la localització de les complementacions del model *knock-down* de MLC1.

En primer lloc es va estudiar la localització de GlialCAM i CIC-2 en les complementacions del model *knock-down* de MLC1 amb MLC1 *wild type*, GlialCAM *wild type*, CIC-2 i GlialCAM+CIC-2, mitjançant immunofluorescència i utilitzant els mateixos adenovirus de sobreexpressió que anteriorment.

Prèviament, es va comprovar que aquestes complementacions amb el miRNA SCR presentaven una correcta localització de GlialCAM i CIC-2, reproduint els resultats observats en astròcits sense infectar (Jeworutzki et al., 2012) (**Figura 79, Annex**).

En realitzar l'estudi de localització de GlialCAM i CIC-2 en les complementacions del model *knock-down* de MLC1, es va observar que GlialCAM es localitzava correctament als contactes astrocitaris en totes les condicions estudiades (**Figura 62 A-D**). Per altra banda, la localització de CIC-2 es mostrava retinguda al voltant del nucli amb les complementacions de MLC1 i CIC-2 (**Figura 62 A i C**). Igual que succeïa en astròcits sense infectar (Jeworutzki et al., 2012), la sobreexpressió de GlialCAM i CIC-2 conjuntament localitzava CIC-2 a les unions astrocitàries en absència de MLC1 (**Figura 62 D**). Però sorprenentment, la manca de MLC1 endògena combinada amb la sobreexpressió de GlialCAM també mostrava una localització de CIC-2 a les unions astrocitàries (**Figura 62 B, fletxes**).

Aquestes noves dades proposaven una possible competició de MLC1 i CIC-2 per GlialCAM, ja que aquesta última és capaç de localitzar a les unions cel·lulars a qualsevol de les dues primeres (Jeworutzki et al., 2012; López-Hernández et al., 2011b). En aquest cas, al generar un model on no hi ha expressió de MLC1, el fet de sobreexpressar GlialCAM provocava el canvi de localització de CIC-2 endògena ja que no existia cap tipus d'interacció GlialCAM-MLC1 i la majoria de molècules de GlialCAM podien interaccionar amb CIC-2.

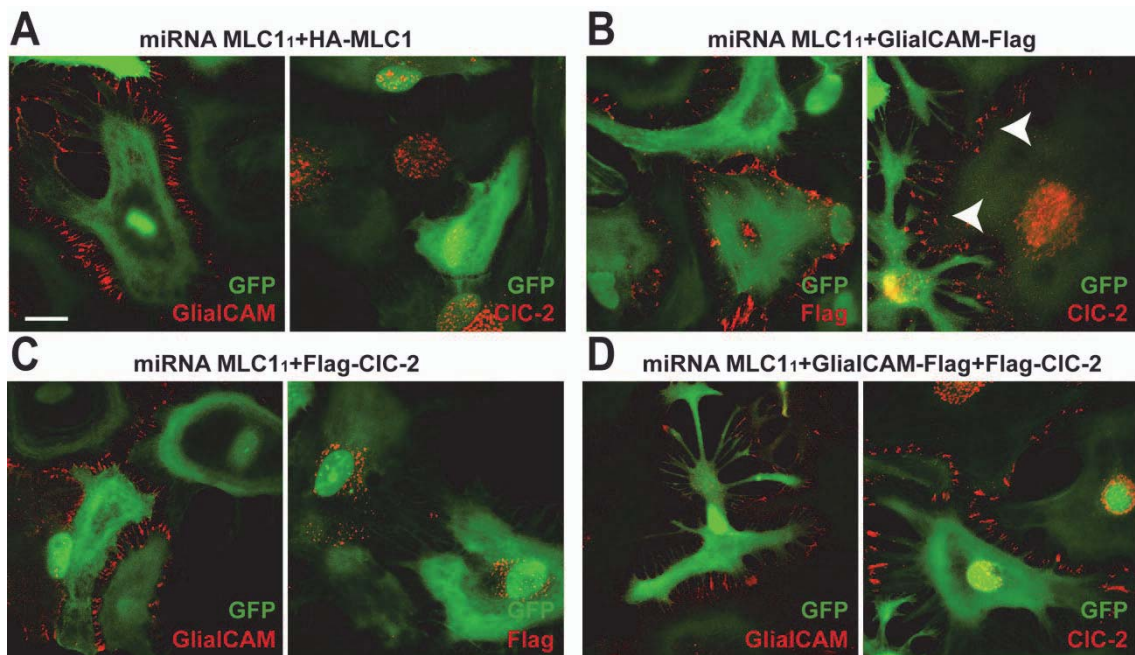


Figura 62. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 en les complementacions del model *knock-down* de MLC1. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA MLC11 a MOI 5 durant 5 dies complementats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (A), GlialCAM-Flag (B), Flag-CIC-2 (C) o GlialCAM-Flag+Flag-CIC-2 (D) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta GlialCAM i CIC-2 endògenes o sobreexpressades segons la condició experimental (en vermell), amb un anticòs comercial contra Flag, un anticòs contra la part C-terminal de GlialCAM o un anticòs contra la part C-terminal de CIC-2. La senyal de GFP identifica els astròcits que expressen el miRNA MLC11. Barra, 20 μ m.

En segon lloc es va estudiar el comportament de les mutacions de MLC1 P92S i S246R utilitzant adenovirus que expressaven aquestes variants mutants humanes amb un epítip HA. La mutació P92S era catalogada com a mutació intermèdia amb uns nivells d'arribada a la membrana plasmàtica menors del 10% de l'arribada de la proteïna *wild type*. En canvi, la mutació S246R era catalogada com a mutació lleu ja que presentava uns nivells a la membrana plasmàtica majors del 60% de l'arribada de la proteïna *wild type*. No es van escollir mutacions catalogades com a severes ja que els nivells d'expressió i l'arribada a membrana eren pràcticament nuls (Duarri et al., 2008).

Tots els estudis realitzats amb mutacions de MLC1, havien mostrat que aquestes presenten una menor arribada a la membrana plasmàtica i una major retenció al reticle endoplasmàtic, probablement degut a un mal plegament provocat per la mutació (Duarri et al., 2008; Lanciotti et al., 2010; Montagna et al., 2006; Teijido et al., 2004). Per això, també es van estudiar models de complementació amb les mutacions P92S i S246R juntament amb GlialCAM, ja que els resultats observats fins al moment, hipotetitzaven que GlialCAM era necessària per la correcta expressió i localització de MLC1.

Mitjançant immunofluorescència, es va estudiar la localització dels mutants en un model astrocitari infectat amb el miRNA SCR com a model control (**Figura 63**). Tal i com es sabia, la sobreexpressió de MLC1 *wild type* localitzava la proteïna a les unions astrocitàries (**Figura 63 A**) i com s'esperava, l'expressió de les variants mutants mostrava una localització molt més retinguda al reticle endoplasmàtic cel·lular (**Figura 63 C i E**).

Per altra banda, la coexpressió de GlialCAM amb les variants mutants de MLC1, mostrava una localització de les mutacions P92S i S246R als contactes astrocitaris tal i com succeïa amb la proteïna *wild type* (**Figura 63 B, D i F**).

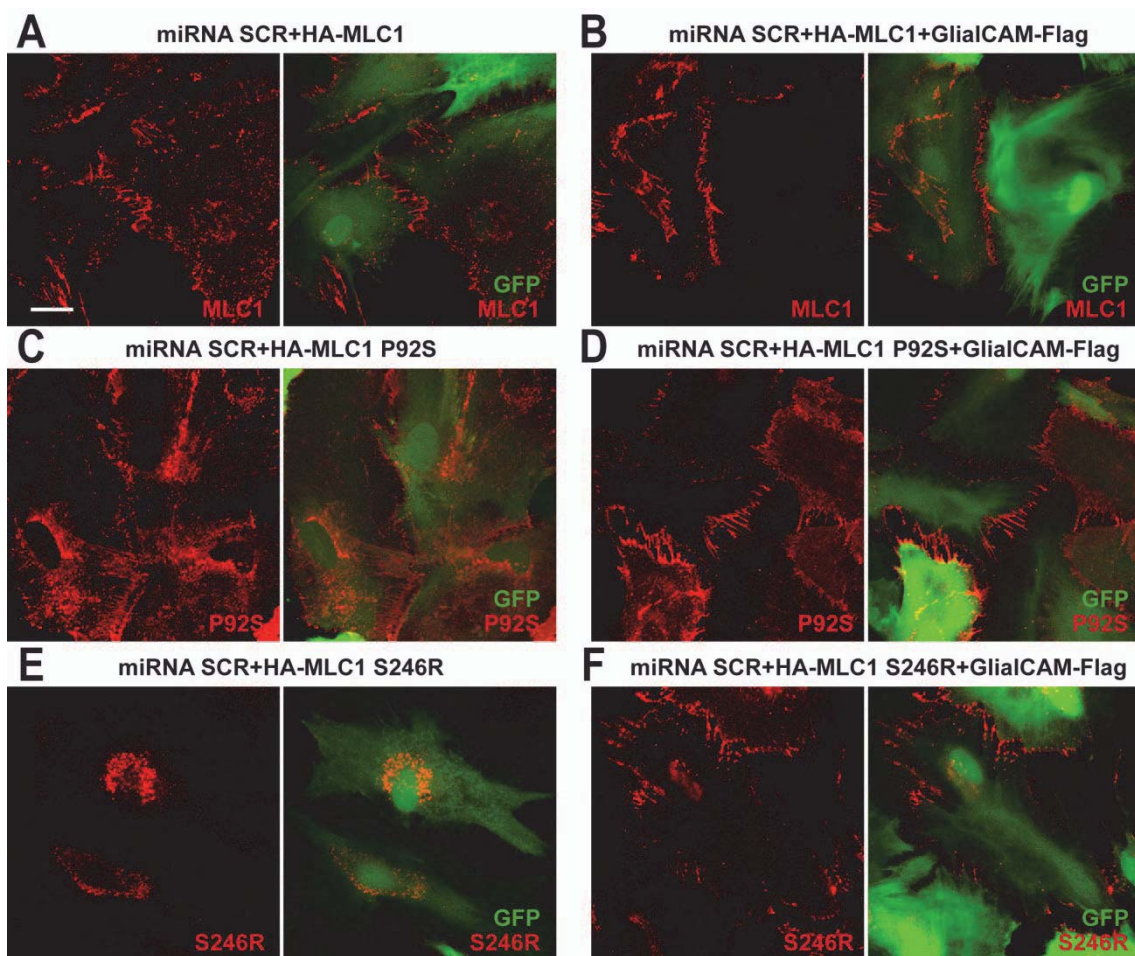


Figura 63. Estudi de la localització dels mutants de MLC1 en el model astrocitari. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 5 dies complementats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (**A**), HA-MLC1+GlialCAM-Flag (**B**), HA-MLC1 P92S (**C**), HA-MLC1 P92S+GlialCAM-Flag (**D**), HA-MLC1 S246R (**E**) o HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag (**F**) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 *wild type* o mutant (en vermell), amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 humana. Es mostra la marca obtinguda i el *merge* amb la senyal de GFP que identifica els astròcits que expressen el miRNA SCR. Barra, 20 µm.

Aquest fet mostrava que GlialCAM era capaç de contrarestar els efectes de retenció al reticle endoplasmàtic causats per les mutacions de MLC1 i localitzar la proteïna a les

unions astrocitàries. Aquests resultats de sobreexpressió van ser reproduïts en astròcits control sense infectar amb cap miRNA per la Dra. Tania López.

Aquest mateix estudi es va realitzar en astròcits del model *knock-down* de MLC1. Es va observar que la manca de MLC1 endògena no influïa en els resultats obtinguts, ja que l'expressió de GlialCAM localitzava les variants mutants P92S i S246R a les unions astrocitàries (**Figura 80, Annex**).

5. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

En desenvolupar els models astrocitaris *knock-down* de MLC1 i GlialCAM, com que les cèl·lules infectades que expressaven els miRNAs també expressaven la GFP de forma constitutiva, es va poder observar l'aparició de vacuoles intracel·lulars en els astròcits (**Figura 64**). Per quantificar aquest possible fenotip vacuolitzant, es va procedir al comptatge de cèl·lules que contenien vacuoles intracel·lulars. Es va considerar que una cèl·lula presentava vacuoles o fenotip vacuolitzant quan s'observaven 3 o més vacuoles intracel·lulars amb un diàmetre major de 1 µm.

En els astròcits infectats amb el miRNA SCR es va observar cert percentatge de cèl·lules amb vacuoles, probablement degut al petit efecte tòxic de la infecció per adenovirus. Es va veure que en infectar a MOI 5 s'observava un 5% de cèl·lules amb vacuoles (**Figura 64 A**), mentre que en infectar a MOI 10 el percentatge augmentava fins al 12% (**Figura 64 B**).

Tot i aquest *background*, l'eliminació de MLC1 per part dels dos miRNAs provocava un augment significatiu de cèl·lules amb vacuoles fins al 20% (**Figura 64 A**). Aquest fenotip vacuolitzant observat en cultius d'astròcits defectius de MLC1 va fer reexaminar la biòpsia d'un pacient de MLC amb una mutació en MLC1, i es va observar que també presentava vacuolització astrocitària. Aquests resultats van definir aquesta vacuolització astrocitària com a nova característica fenotípica de MLC (Duarri et al., 2011).

L'eliminació de GlialCAM per part dels dos miRNAs utilitzats en el model *knock-down* de GlialCAM, també provocava un augment significativament estadístic de cèl·lules que presentaven vacuoles. En aquest model cel·lular, es va observar un 30% de cèl·lules que presentaven vacuoles (**Figura 64 B**).

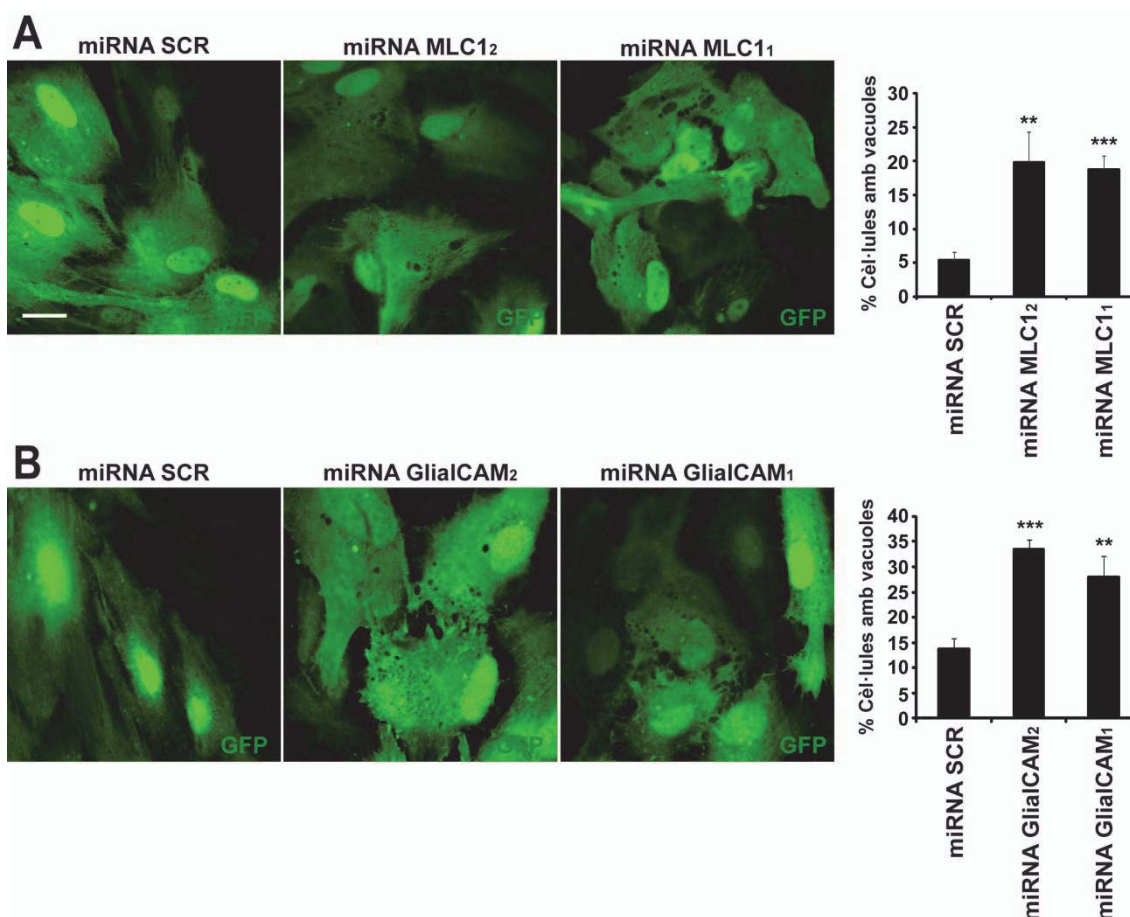


Figura 64. Caracterització fenotípica dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. **A.** Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA MLC12 o miRNA MLC11 a MOI 5 durant 5 dies. Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1 μ m. Dades corresponents a 3-5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1009); miRNA MLC12 (n=354) miRNA MLC11 (n=1064). **B.** Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM2 o miRNA GlialCAM1 a MOI 10 durant 7 dies. Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1 μ m. Dades corresponents a 5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1483); miRNA GlialCAM2 (n=1634); miRNA GlialCAM1 (n=1646); ** p<0.01; *** p<0.001 respecte miRNA SCR de cada condició experimental; t-student no aparellada. La senyal de GFP marca les cèl·lules infectades amb els miRNA. Barra, 20 μ m.

Per avançar en la caracterització fenotípica dels dos fenotips, es va caracteritzar el percentatge de cèl·lules amb vacuoles de totes les complementacions efectuades en els dos models *knock-down* (Figures 65 i 66).

La vacuolització observada en el model *knock-down* de MLC1 era específicament causada per la manca de MLC1, ja que la complementació amb MLC1 *wild type* humana recuperava el fenotip fins a nivells control (Figura 65, barra vermella). En canvi, la sobreexpressió de GlialCAM (Figura 65, barra groga), CIC-2 (Figura 65, barra verd fosc) o de les dues proteïnes a la vegada (Figura 65, barra verd clar) no provocava aquesta recuperació del fenotip vacuolitzant. Aquests resultats indicaven

que la proteïna que causava les vacuoles astrocitàries era MLC1 ja que únicament es recuperava el fenotip quan hi havia expressió d'aquesta proteïna.

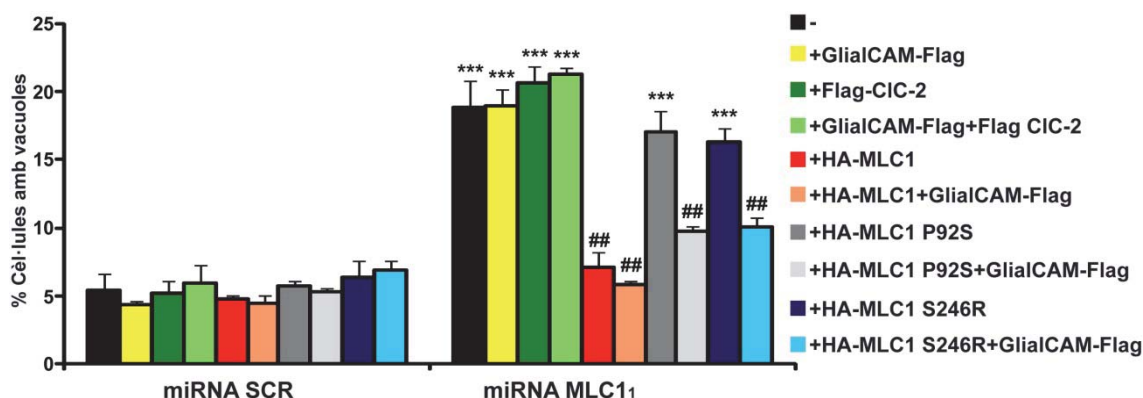


Figura 65. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de MLC1. Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA MLC1 (negre) a MOI 5 durant 5 dies o les respectives complementacions amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (groc), Flag-CIC-2 (verd fosc), GlialCAM-Flag+Flag-CIC-2 (verd clar), HA-MLC1 (vermell), HA-MLC1+GlialCAM-Flag (rosa), HA-MLC1 P92S (gris fosc), HA-MLC1 P92S+GlialCAM-Flag (gris clar), HA-MLC1 S246R (blau fosc) o HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag (blau clar) a MOI 2 durant 2 dies. Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1µm. Dades corresponents a 4-5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1009); miRNA MLC1 (n=1064); miRNA SCR+GlialCAM-Flag (n=858); miRNA MLC1+GlialCAM-Flag (n=1164); miRNA SCR+Flag-CIC-2 (n=715); miRNA MLC1+Flag-CIC-2 (n=1268); miRNA SCR+GlialCAM-Flag+Flag-CIC-2 (n=988); miRNA MLC1+GlialCAM-Flag+Flag-CIC-2 (n=1100); miRNA SCR+HA-MLC1 (n=1112); miRNA MLC1+HA-MLC1 (n=1094); miRNA SCR+HA-MLC1+GlialCAM-Flag (n=1360); miRNA MLC1+HA-MLC1+GlialCAM-Flag (n=1283); miRNA SCR+HA-MLC1 P92S (n=1321); miRNA MLC1+HA-MLC1 P92S (n=1585); miRNA SCR+HA-MLC1 P92S+GlialCAM-Flag (n=1290); miRNA MLC1+HA-MLC1 P92S+GlialCAM-Flag (n=1379); miRNA SCR+HA-MLC1 S246R (n=948); miRNA MLC1+HA-MLC1 S246R (n=1248); miRNA SCR+HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag (n=1188); miRNA MLC1+HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag (n=1203).). *** p<0.001 respecte cada miRNA SCR del grup experimental corresponent; ## p<0.01 respecte miRNA MLC1, excloent la significació estadística dels grups control (miRNA SCR); t-student no aparellada.

L'expressió dels mutants de MLC1 P92S i S246R tampoc aconseguia revertir l'efecte fenotípic (Figura 65, barra gris fosc i barra blau fosc), segurament degut a la retenció intracel·lular que pateixen aquestes variants mutants. Sorprenentment, la coexpressió d'aquestes mutacions juntament amb GlialCAM si que va mostrar una reducció significativa de cèl·lules que presentaven vacuoles (Figura 65, barra gris clar i barra blau clar). Aquesta recuperació fenotípica podia ser deguda a la localització de les variants mutants a les unions astrocitàries per part de GlialCAM. La coexpressió de MLC1 *wild type* i GlialCAM també recuperava el fenotip astrocitàri (Figura 65, barra rosa).

El fenotip de vacuolització astrocitària observat en el model *knock-down* de GlialCAM també era específicament causat per la manca de GlialCAM endògena, ja que la complementació amb GlialCAM *wild type* humana feia recuperar el percentatge de

cèl·lules amb vacuoles fins a nivells control (**Figura 66, barra groga**). L'expressió de les variants mutants de GlialCAM R92W i R92Q no revertien el fenotip vacuolitzant (**Figura 66, barra blava i barra gris**), mentre que els mutants S196Y i P148S causaven una recuperació del fenotip estadísticament significativa (**Figura 66, barra verd clar i barra taronja**). Aquest fet indicava que la molècula implicada en la vacuolització astrocitària del model era MLC1, ja que l'expressió de GlialCAM *wild type* o de les variants S196Y i P148S localitzava MLC1 endògena a les unions astrocitàries, mentre que l'expressió dels mutants R92W o R92Q no ho aconseguia. La complementació del model amb MLC1 *wild type* (**Figura 66, barra vermella**) reforçava aquesta hipòtesi ja que no recuperava el fenotip vacuolitzant, probablement degut a la retenció intracel·lular que mostra la sobreexpressió de MLC1 en absència de GlialCAM endògena. Finalment, l'expressió de CIC-2 no revertia el fenotip astrocitari del model *knock-down* de GlialCAM (**Figura 66, barra verd fosc**).

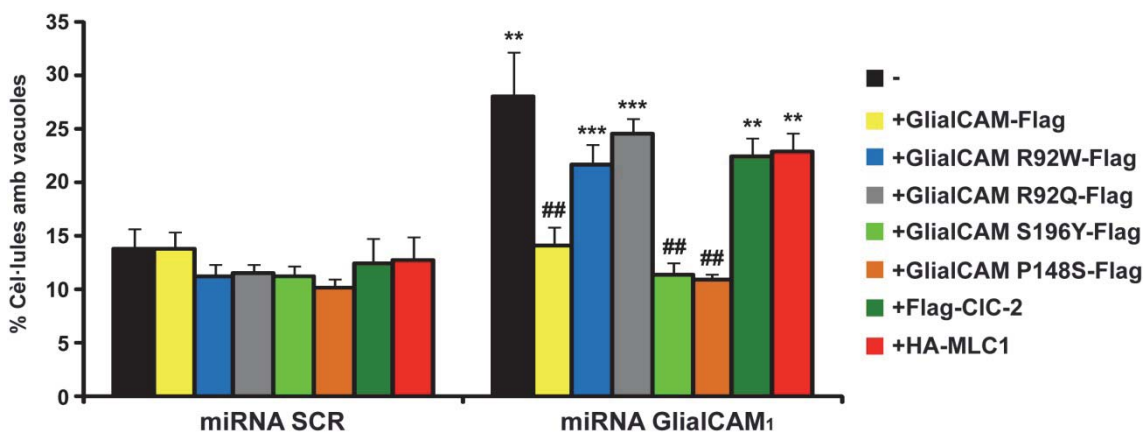


Figura 66. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM. Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA GlialCAM1 (**negre**) a MOI 10 durant 7 dies o les respectives complementacions amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (**groc**), GlialCAM R92W-Flag (**blau**), GlialCAM R92Q-Flag (**gris**), GlialCAM S196Y-Flag (**verd clar**), GlialCAM P148S-Flag (**taronja**), Flag-CIC-2 (**verd fosc**) o HA-MLC1 (**vermell**) a MOI 2 durant 2 dies. Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1µm. Dades corresponents a 5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1483); miRNA GlialCAM1 (n=1646); miRNA SCR+GlialCAM-Flag (n=1620); (n=1753); miRNA GlialCAM1+GlialCAM-Flag (n=1502); miRNA SCR+GlialCAM R92W-Flag (n=1553); miRNA GlialCAM1+GlialCAM R92W-Flag (n=1776); miRNA SCR+GlialCAM R92Q-Flag (n=1510); miRNA GlialCAM1+GlialCAM R92Q-Flag (n=1917); miRNA SCR+GlialCAM S196Y-Flag (n=1561); miRNA GlialCAM1+GlialCAM S196Y-Flag (n=1659); miRNA SCR+GlialCAM P148S-Flag (n=1634); miRNA GlialCAM1+GlialCAM P148S-Flag (n=1651); miRNA SCR+Flag-CIC-2 (n=1338); miRNA GlialCAM1+Flag-CIC-2 (n=1840); miRNA SCR+HA-MLC1 (n=1640); miRNA GlialCAM1+HA-MLC1 (n=1606). ** p<0.01; *** p<0.001 respecte cada miRNA SCR del grup experimental corresponent; ## p<0.01 respecte miRNA GlialCAM1, excloent la significació estadística dels grups control (miRNA SCR); t-student no aparellada.

Els resultats observats en la complementació del model *knock-down* de GlialCAM, es reproduïen amb la complementació del model generat amb el miRNA GlialCAM2 (**Figura 81, Annex**).

6. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

El fenotip vacuolitzant observat en els pacients amb MLC i en els models cel·lulars astrocitaris generats, relacionava MLC1 i/o GlialCAM funcionalment amb la regulació del volum cel·lular dels astròcits. Es va voler fer un estudi funcional dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM per intentar avançar en el coneixement de la funció de les dues proteïnes.

6.1. Estudis del mecanisme de regulació de canvis de volum RVD.

Una tècnica que permet monitoritzar el mecanisme de RVD és la tècnica d'imatge per calceïna, que utilitza la fluorescència per estudiar la recuperació del volum després d'un xoc osmòtic. Es va realitzar l'estudi de la implicació funcional de MLC1 amb aquest mecanisme.

Per evitar interferències entre la calceïna i la GFP expressada en els miRNAs del model (les dues s'exciten a 488 nm), es van generar adenovirus que expressaven el miRNA SCR i el miRNA MLC1₁ fusionats a la proteïna Cherry (s'excita a 568 nm). Així es controlava els astròcits que expressaven els miRNAs i no hi havia interferència a l'hora de quantificar la intensitat de fluorescència produïda per la calceïna.

Es va voler estudiar els efectes tant de l'absència com de la sobreexpressió de MLC1 per tant, es van realitzar les mesures de RVD en astròcits sense infectar, infectats amb el miRNA SCR, el miRNA MLC1₁ o l'adenovirus que sobreexpressa MLC1 *wild type*.

Es van tractar els diferents tipus de cultius amb una solució fisiològica (300 mOsm) durant 5 minuts, posteriorment es va aplicar un xoc osmòtic tractant el cultiu amb una solució hipoosmòtica (180 mOsm) durant 30 minuts i finalment es va tornar a la solució fisiològica durant 5 minuts. Aquest tractament permetia observar el canvi de volum cel·lular produït pel canvi d'osmolaritat del medi, fet que indicava que les cèl·lules reaccionaven correctament i posteriorment, permetia observar el retorn al volum cel·lular inicial provocat per l'activació del mecanisme de RVD. Finalment l'últim període amb solució fisiològica servia per confirmar que les cèl·lules continuaven reaccionant als canvis d'osmolaritat.

Es va observar que tots els grups es comportaven correctament davant d'un xoc osmòtic i amb qüestió de pocs minuts s'observava l'activació del mecanisme de RVD i com les cèl·lules iniciaven la recuperació del volum inicial (**Figura 67 A-D**).

En analitzar específicament l'activitat RVD calculant el percentatge de recuperació respecte el volum inicial, es va observar que la manca de MLC1 provocava una recuperació del $87.98 \pm 8.9 \%$ i per tant, presentava una petita disminució de l'activitat (**Figura 67 E**). Aquesta disminució es veia reflectida en calcular el temps de RVD (temps que es tarda en recuperar el volum inicial) ja que els astròcits defectius de MLC1 no recuperaven el volum inicial en els 30 minuts d'incubació amb solució hiposmòtica, mentre que en la resta de condicions s'aconseguia recuperar el volum inicial amb 18-20 minuts (**Figura 67 F**).

Paral·lelament, estudis realitzats en limfoblasts de pacients de MLC i en cultius d'astròcits defectius de MLC1, també van mostrar una disminució del mecanisme de RVD en absència de MLC1 (Ridder et al., 2011).

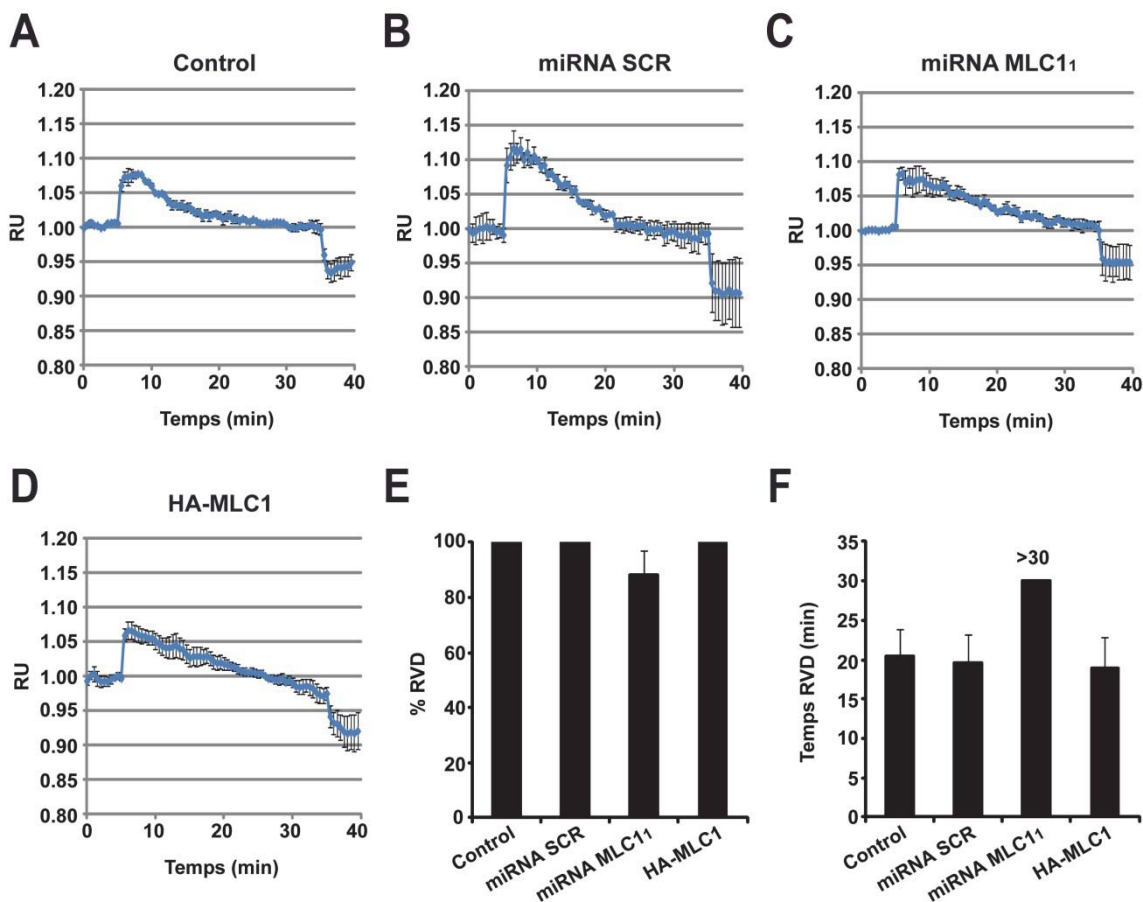


Figura 67. Assaig de mesura dels canvis de volum mitjançant calceïna. Representació relativitzada dels canvis de la intensitat de fluorescència de la calceïna provocats per canvis del volum cel·lular en cultius primaris d'astròcits de rata control (**A**), infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR (**B**) o miRNA 905 (**C**) a MOI 5 durant 5 dies o infectats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (**D**) a MOI 2 durant 2 dies. **E**. Càlcul del percentatge de recuperació respecte el volum inicial o percentatge de RVD, dels grups anteriors. **F**. Càlcul del temps de RVD o temps que es tarda en recuperar el volum inicial dels grups anteriors. Dades corresponents a 3-4 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: control (n=38); miRNA SCR (n=54); miRNA 905 (n=45); HA-MLC1 (n=54).

6.2. Estudis electrofisiològics dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM.

La falta de MLC1 en astròcits de rata o en limfoblasts de pacients amb MLC també s'ha relacionat amb una disminució de l'activació de l'activitat VRAC (Ridder et al., 2011), per la qual encara no es coneix la molècula implicada (Jentsch et al., 2002). Per altra banda, s'ha descrit que GlialCAM actua com a subunitat auxiliar de CIC-2 causant l'activació del canal (Jeworutzki et al., 2012). L'activitat VRAC està fortament implicada en els mecanismes de regulació del volum cel·lular i activitats de canals de Cl⁻ com CIC-2 també s'han relacionat amb aquests tipus de processos. Per això, es va fer un estudi tant de l'activitat de CIC-2 com de l'activitat VRAC en els models *knock-down* de MLC1 i de GlialCAM.

Els estudis previs per registrar les corrents de VRAC havien estat realitzats en astròcits tractats amb tripsina (Ridder et al., 2011) i en aquest tipus d'astròcits no es detecta l'activitat del canal CIC-2 (Parkerson and Sontheimer, 2004). Per tant, es va tractar els astròcits amb dibutiril AMPc (diBAMPc) que provoca la generació d'un model astrocitari que expressa els dos tipus de canals que es volia estudiar (Ferroni et al., 1997). Aquests astròcits es van infectar amb el miRNA SCR, el miRNA MLC1₁ i el miRNA GlialCAM₁ seguint les mateixes condicions d'infecció posades apunt al laboratori.

Tots els estudis electrofisiològics es van realitzar en col·laboració amb el Dr. Xavier Gasull de la Universitat de Barcelona (UB-IDIBAPS).

Com que CIC-2 i VRAC són dues activitats que impliquen corrents de clorur, es va haver de diferenciar bé quin tipus de corrents s'estaven registrant. Per estudiar l'activitat de CIC-2, es van comptabilitzar els astròcits que presentaven corrents de CIC-2 en condicions isotòniques que eren un 40%, ja que s'havia descrit que no tots els astròcits expressaven el RNA missatger de CIC-2 en condicions isotòniques (Benesova et al., 2012). A més a més, el medi contenia el potent inhibidor de VRAC DCPIB (Zhang et al., 2008). Posteriorment, es confirmava que les corrents eren degudes a l'activitat CIC-2 observant la inhibició per iode (Jeworutzki et al., 2012), però no per Tamoxifen que és un altre inhibidor de VRAC.

Els estudis electrofisiològics de l'activitat de CIC-2 van mostrar que l'absència de MLC1 o de GlialCAM no afectava ni les corrents de CIC-2 ni les propietats d'inactivació o rectificació del canal (**Figura 68**).

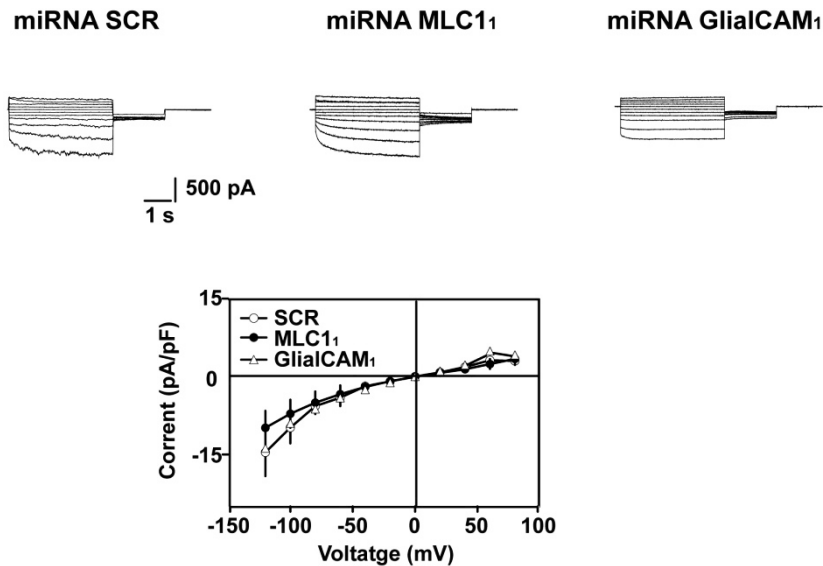


Figura 68. Mesura de l'activitat CIC-2 en astròcits dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. Registres representatius de les corrents de clorur detectades en astròcits primaris de rata tractats amb diBAMPc i infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 5 dies, miRNA MLC1 a MOI 5 durant 5 dies o miRNA GlialCAM1 a MOI 10 durant 7 dies. S'han seleccionat astròcits que presenten corrents de CIC-2 en condicions isotòniques. Es mostra la representació de la relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady state*) dels astròcits infectats amb miRNA SCR (**rodones**), miRNA MLC1 (**rodones negres**) i miRNA GlialCAM1 (**triangles**) en condicions isotòniques. Dades corresponents als següents nombres de registres: miRNA SCR (n=13); miRNA MLC1 (n=9); miRNA GlialCAM1 (n=17).

Per poder estudiar l'activitat VRAC, es va registrar els astròcits que en condicions isotòniques no presentaven activitat CIC-2 que eren al voltant d'un 60%. D'aquests astròcits, un 85% mostraven activitat VRAC en condicions hipotòniques. A més a més, es comprovava que els registres eren de l'activitat VRAC observant la inhibició de les corrents per DCPIB i que no es produís cap efecte amb la inhibició per iode.

Es va observar que tant la manca de MLC1 com la manca de GlialCAM provocaven una reducció del 80% de l'activitat VRAC en condicions hipotòniques (**Figura 69**).

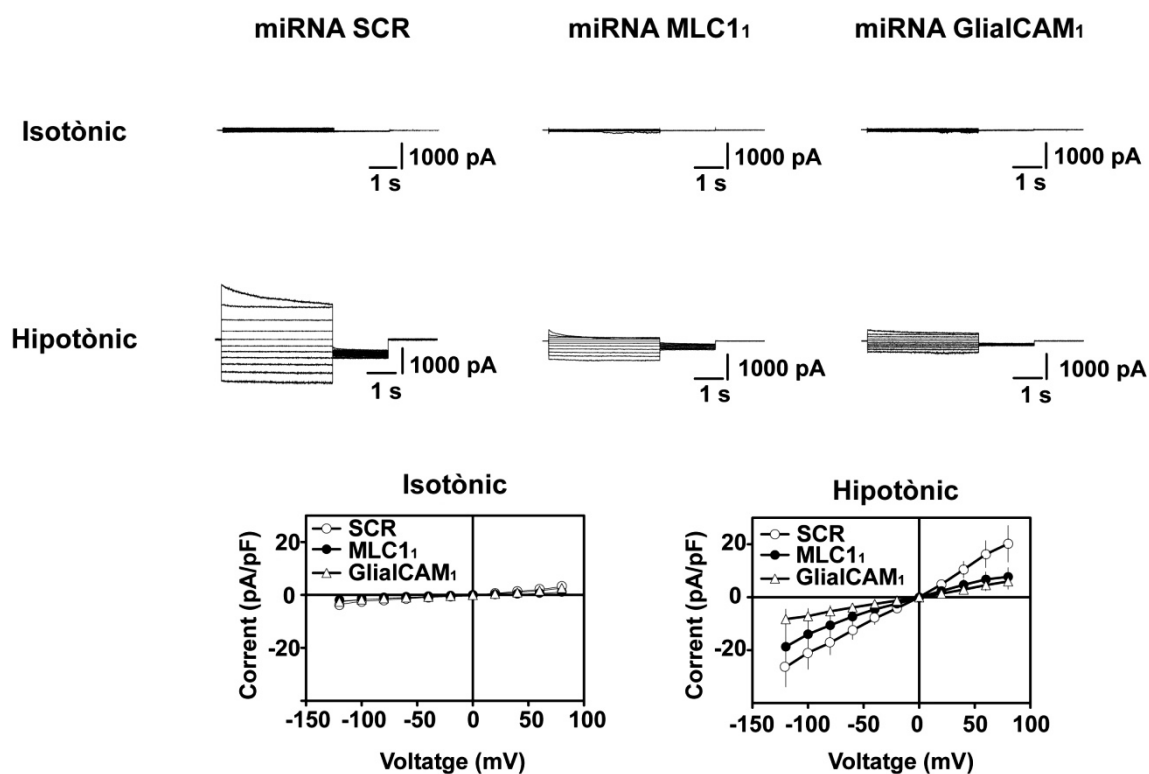


Figura 69. Mesura de l'activitat VRAC en astròcits dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM. Registres representatius de les corrents de clorur detectades en astròcits primaris de rata tractats amb diBAMPC i infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 5 dies, miRNA MLC1₁ a MOI 5 durant 5 dies o miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies. S'han seleccionat astròcits que no presenten corrents de CIC-2 en condicions isotòniques i que presenten activitat VRAC en condicions hipotòniques. Es mostra la representació de la relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady state*) dels astròcits infectats amb miRNA SCR (**rodones**), miRNA MLC1₁ (**rodones negres**) i miRNA GlialCAM₁ (**triangles**) en condicions isotòniques i hipotòniques. Dades corresponents als següents nombres de registres: miRNA SCR (n=15); miRNA MLC1₁ (n=14); miRNA GlialCAM₁ (n=14).

Posteriorment, es va estudiar l'activitat VRAC de cultius astrocitaris tractats amb diBAMPC els quals se'ls havia sobreexpressat MLC1 *wild type*, GlialCAM, el mutant MLC1 S246R i el mutant S246R juntament amb GlialCAM (**Figura 70**).

Es va observar que la sobreexpressió de MLC1 *wild type* provocava un augment de l'activitat VRAC dels cultius astrocitaris mentre que la sobreexpressió de GlialCAM no provocava cap efecte sobre aquesta activitat. Per altra banda, l'expressió del mutant de MLC1 S246R tampoc provocava canvis en l'activitat VRAC si es sobreexpressava sol. En canvi, la coexpressió del mutant juntament amb GlialCAM provocava un augment de l'activitat VRAC significativament estadístic.

Aquests resultats relacionaven directament l'activitat VRAC amb MLC1 i indicaven que la localització de la proteïna a les unions astrocitàries era necessària per aquesta relació funcional.

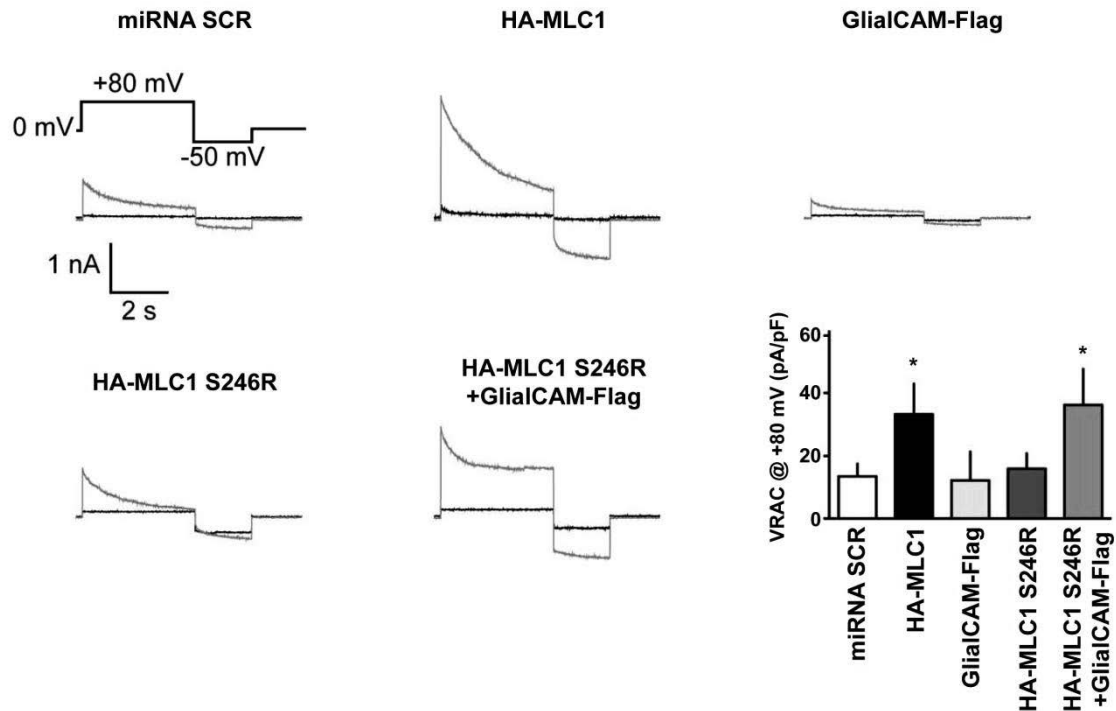


Figura 70. Mesura de l'activitat VRAC en astròcits dels models de sobreexpressió. Registres representatius a +80 mV de les corrents de clorur en condicions isotòniques (registres negres) o hipotòniques (registres grisos), detectades en astròcits de rata tractats amb diBAMPc i infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 5 dies o amb adenovirus que expressen HA-MLC1, GlialCAM-Flag, HA-MLC1 S246R o HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag a MOI 2 durant 2 dies. S'han seleccionat astròcits que no presenten corrents de CIC-2 en condicions isotòniques i que presenten activitat VRAC en condicions hipotòniques. Es mostra el protocol utilitzat. El gràfic representa la mitja dels valors de conductància a +80 mV en condicions hipotòniques. Dades corresponents al següent nombre de registres: miRNA SCR (n=9); HA-MLC1 (n=8); GlialCAM-Flag (n=5); HA-MLC1 S246R (n=9); HA-MLC1+GlialCAM-Flag (n=9). * $p < 0.05$ respecte miRNA SCR; t-student no aparellada.

6.3. Estudis de la monitorització de la sortida d'osmòlits orgànics durant el procés de recuperació del volum (RVD).

En resposta a l'augment de volum dels astròcits, tant en condicions fisiològiques com en estats patològics, es produeix l'alliberació d'ions i osmòlits orgànics com el glutamat, l'aspartat o la taurina entre d'altres, com a part del procés de recuperació del volum RVD (*regulatory volume decrease*) (Kimelberg et al., 1990; Mulligan and MacVicar, 2006; Pasantés-Morales and Martín del Río, 1990). Aquest procés es realitza a través de l'activitat VSOAC per la qual no es coneix l'entitat molecular (Anderson and Swanson, 2000; Kimelberg, 2005).

Es va estudiar la relació de MLC1 amb el flux d'osmòlits orgànics. Per això es va monitoritzar la sortida d'aspartat causada pels canvis de volum provocats per un xoc hiposmòtic. Es van utilitzar cultius astrocitaris sense infectar, infectats amb el miRNA SCR, el miRNA MLC1₁ o l'adenovirus que sobreexpressa MLC1 *wild type* per poder estudiar les condicions d'absència o de sobreexpressió de la proteïna.

Per portar a terme aquests estudis es va utilitzar aspartat radioactiu marcat amb triti (H^3 -D-Aspartat) i es va monitoritzar el flux d'aquest osmòlit amb el temps. Es van carregar amb el H^3 -D-Aspartat els diferents cultius i es va mesurar la sortida d'aspartat radioactiu en el temps en condicions fisiològiques i en condicions hipoosmòtiques (Figura 71).

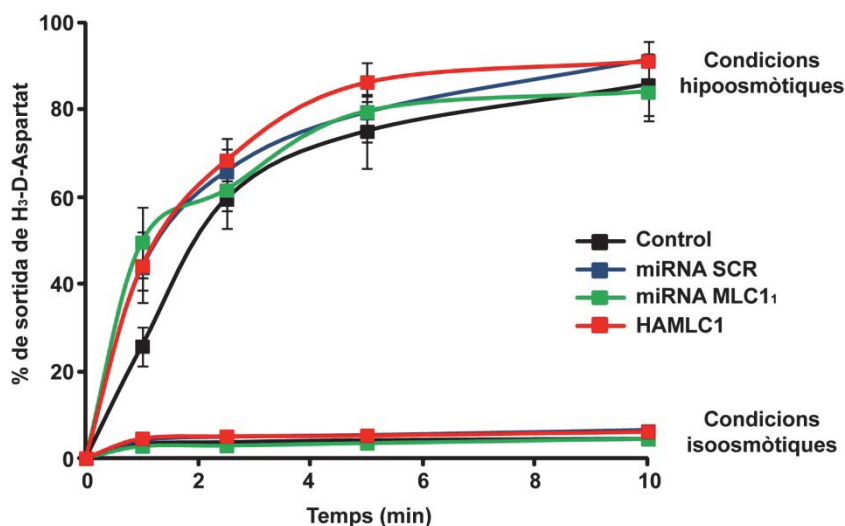


Figura 71. Assaig de mesura del flux de sortida d'aspartat radioactiu H^3 -D-Aspartat. Representació del percentatge de sortida d'aspartat respecte el temps en condicions fisiològiques (sota) i en condicions hipoosmòtiques (sobre) en cultius primaris d'astròcits de rata control (negre), infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR (blau) o miRNA MLC1₁ (verd) a MOI 5 durant 5 dies o infectats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (vermell) a MOI 2 durant 2 dies. Dades corresponents a 8-14 experiments independents en condicions fisiològiques i 13-18 experiments independents en condicions hipoosmòtiques.

Tant en condicions isoosmòtiques com en condicions hipoosmòtiques no es van observar canvis en la sortida d'aspartat en els astròcits que no presentaven MLC1, ni en els astròcits que sobreexpressaven MLC1 respecte els astròcits control. Per tant, no es van trobar evidències de la relació de MLC1 amb la regulació del flux d'osmòlits orgànics ni amb l'activitat VSOAC.

7. CARACTERITZACIÓ DE LES VACUOLES ASTROCITÀRIES DELS MODELS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

Una possible conseqüència de la disminució de l'activitat VRAC en el control del volum cel·lular és l'acumulació d'aigua dins la cèl·lula. Els astròcits són cèl·lules molt permeables i una possible solució a l'acumulació intracel·lular d'aigua podria ser l'emmagatzematge d'aquesta en vacuoles intracel·lulars. Per això, es va voler estudiar la possible relació entre la disminució de l'activitat VRAC provocada per la manca de MLC1 i el fenotip vacuolitzant observat en els models *knock-down*.

Els canvis de volum en cultius astrocitaris tractats amb medi hipoosmòtic durant 24 hores causen l'aparició de vacuoles al citoplasma degut a l'acumulació d'aigua. Aquestes vacuoles són d'origen endosomal ja que es marquen positivament amb un anticòs contra la proteïna marcadora d'endosomes EEA1 (*Early-endosomal antigen 1*) (Brignone et al., 2011). Per estudiar si les vacuoles aparegudes en els models *knock-down* tenien un origen similar a les aparegudes a causa del tractament hipoosmòtic, es van realitzar immunofluorescències de la proteïna EEA1 als models *knock-down* (Figura 72).

Es van reproduir les vacuoles EEA1 positives en astròcits del model infectats amb miRNA SCR tractats amb medi hipoosmòtic durant 24 hores (Figura 72 F). A més a més, es va observar que les vacuoles del fenotip astrocitari dels cultius defectius de MLC1 o de GlialCAM també presentaven una marca EEA1 positiva (Figura 72 B i C).

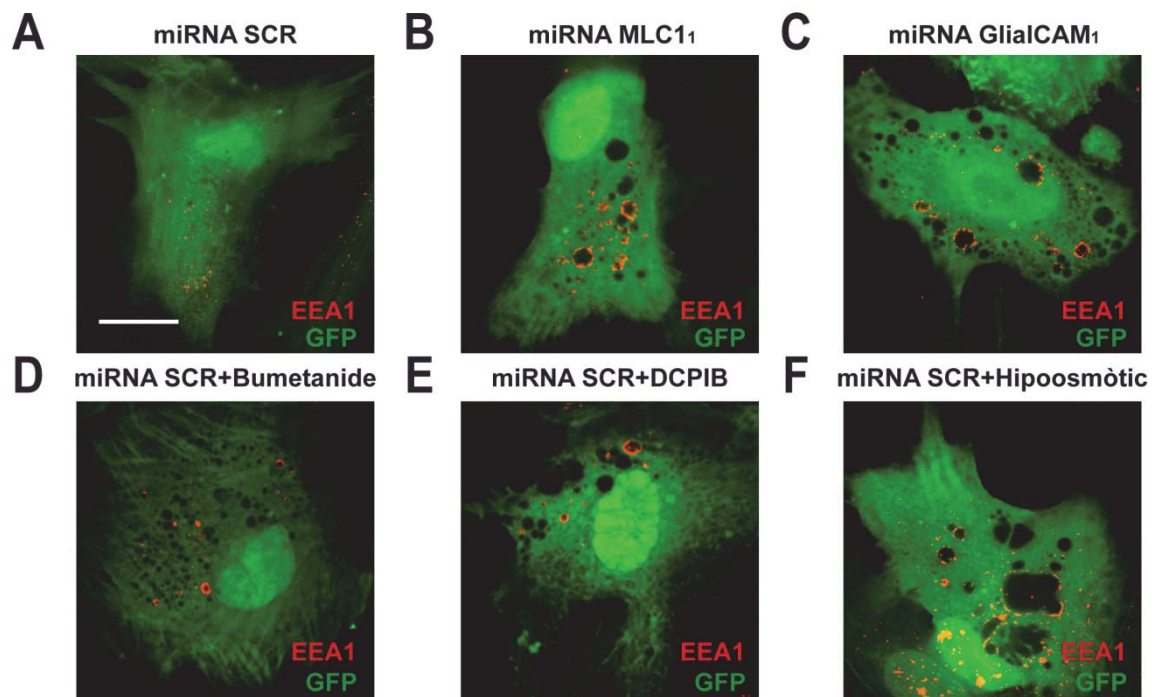


Figura 72. Caracterització de les vacuoles astrocitàries. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 7 dies (A), miRNA MLC1 a MOI 5 durant 5 dies (B), miRNA GlialCAM₁ a MOI 10 durant 7 dies (C) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 7 dies tractats amb Bumetanide (D) o DCPIB (E) durant 7 dies o amb medi hipoosmòtic durant 24 hores (F), analitzats per immunofluorescència. Es detecta el marcador endosomal EEA1 (en vermell), amb un anticòs comercial contra EEA1. La senyal de GFP identifica els astròcits que expressen els miRNAs. Barra, 20 µm.

Finalment, també es va observar l'aparició de vacuoles EEA1 positives en astròcits tractats durant 7 dies (temps màxim de generació dels models *knock-down*) amb inhibidors farmacològics de l'activitat VRAC com Bumetanide i DCPIB (Figura 72 D i E). La Bumetanide bloqueja els cotransportadors de sodi/potassi/clorur i indirectament

l'activitat VRAC es veu afectada (Gagnon et al., 2007; Jayakumar et al., 2011; Su et al., 2002a, 2002b). Per altra banda el DCPIB és l'inhibidor conegut més específic de l'activitat VRAC (Zhang et al., 2008).

Per tant, l'absència de MLC1 o GlialCAM i la inhibició farmacològica de l'activitat VRAC portaven a l'aparició de vacuoles del mateix origen endosomal.

També s'ha descrit que MLC1 es localitza al voltant de les vacuoles intracel·lulars aparegudes a causa del tractament amb medi hipoosmòtic (Brignone et al., 2011). Per això, es va estudiar mitjançant immunofluorescència la localització de MLC1 en astròcits tractats amb inhibidors de VRAC. A més a més, també es va fer aquest estudi sobreexpressant la proteïna MLC1 humana per veure si presentava la mateixa localització i si aquesta sobreexpressió aconseguia reduir l'aparició de vacuoles intracel·lulars (**Figura 73**).

Es va reproduir en el model la localització ja descrita de MLC1 al voltant de les vacuoles en astròcits tractats amb medi hipoosmòtic (**Figura 73 C**). Per altra banda, també es va observar una localització semblant en els astròcits tractats amb els inhibidors de VRAC (**Figura 73 A i B**).

La proteïna MLC1 sobreexpressada també es localitzava majoritàriament envoltant les vacuoles en els astròcits tractats amb els inhibidors o amb el medi hipoosmòtic (**Figura 73 D-F**).

Un cop realitzat el percentatge de cèl·lules que presentaven vacuoles, es va observar que els tres tractaments generaven l'aparició de vacuoles intracel·lulars i que la sobreexpressió de MLC1 no feia cap efecte sobre aquesta vacuolització (**Figura 73 G**). Això podria ser degut a la deslocalització de MLC1 de les unions astrocitàries provocada pels tractaments.

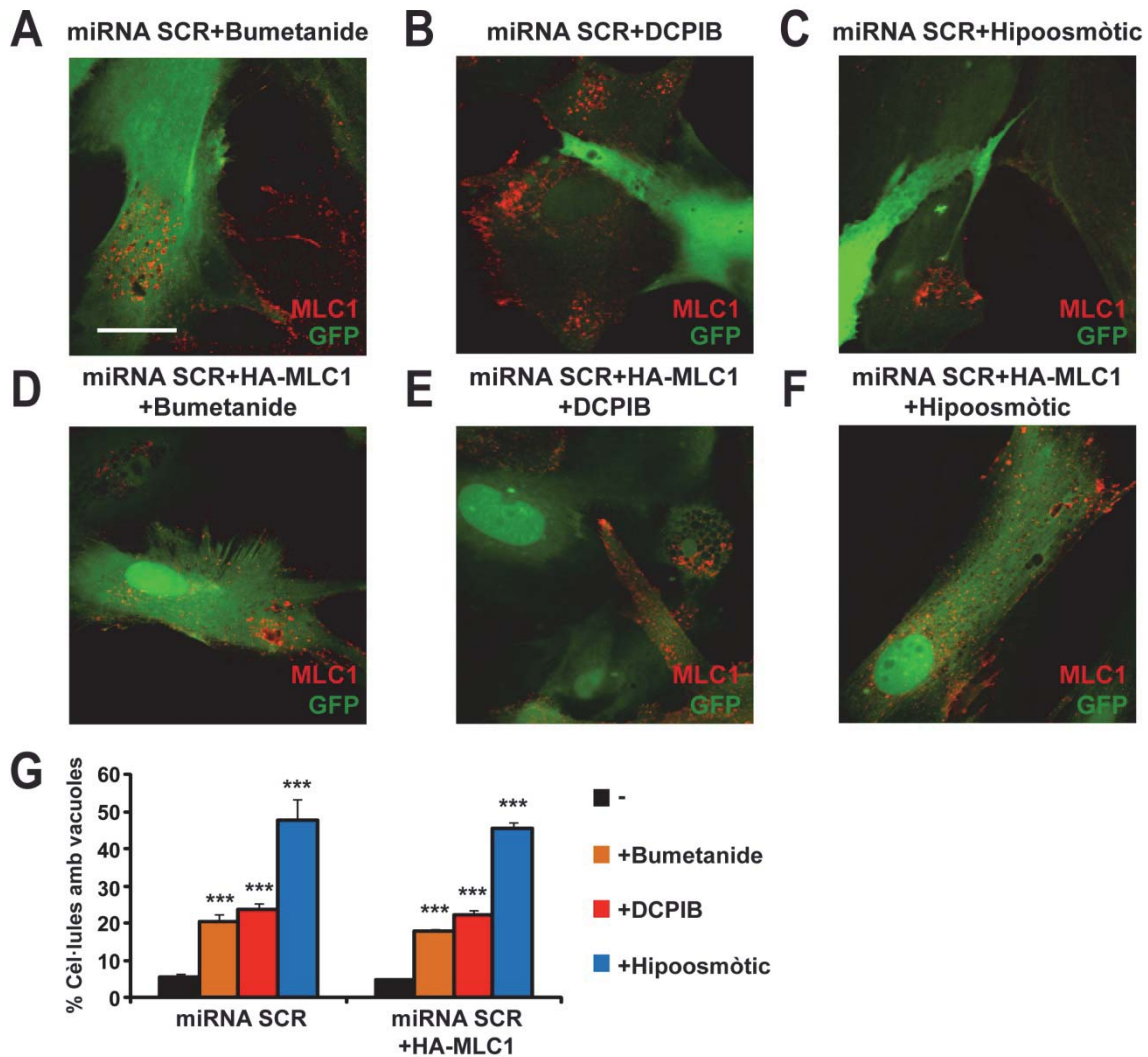


Figura 73. Localització de MLC1 en astròcits tractats amb inhibidors. (A-C) Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 7 dies tractats amb Bumetanide o DCPIB durant 7 dies o amb medi hipoosmòtic durant 24 hores, analitzats per immunofluorescència. (D-F) Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 7 dies i HA-MLC1 a MOI 2 durant 2 dies, tractats amb Bumetanide o DCPIB durant 7 dies o amb medi hipoosmòtic durant 24 hores, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 (en vermell), utilitzant un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 de ratolí (A-C) o un anticòs contra la part N-Terminal de MLC1 humana (D-F). La senyal de GFP identifica els astròcits que expressen el miRNA SCR. Barra, 20 μ m. (G) Quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1 μ m dels grups descrits anteriorment. Dades corresponents a 4-5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1009); miRNA SCR+HA-MLC1 (n=1112); miRNA SCR+Bumetanide (n=1033); miRNA SCR+HA-MLC1+Bumetanide (n=942); miRNA SCR+DCPIB (n=1226); miRNA SCR+HA-MLC1+DCPIB (n=967); miRNA SCR+Hipoosmòtic (n=1067); miRNA SCR+HA-MLC1+Hipoosmòtic (n=1064); *** p<0.001 respecte cada miRNA SCR corresponent; t-student no aparellada.

8. ESTUDIS PER IDENTIFICAR LA PUTATIVA FUNCIÓ DE MLC1.

En el grup es van realitzar diversos assajos electrofisiològics per determinar si MLC1 era l'entitat molecular de l'activitat VRAC. Mitjançant estudis de *voltage clamp* en sistemes heteròlegs com els oòcits de *Xenopus laevis* es va observar que ni l'expressió de MLC1 ni la coexpressió de MLC1 amb GlialCAM provocaven corrents de Cl⁻ de l'activitat VRAC (dades no mostrades). A més a més, els estudis realitzats en

cèl·lules i en limfoblasts de pacients de MLC no permeten concloure que MLC1 sigui la molècula responsable de VRAC (Ridder et al., 2011). Finalment, els estudis realitzats en aquest capítol de Tesi amb el model *knock-down* de MLC1 mostraven que amb l'eliminació de MLC1 l'activitat VRAC es disminuïa però no desapareixia i per tant, s'implicava MLC1 amb aquesta activitat però s'observava que MLC1 no era l'entitat molecular responsable de VRAC.

Un altre factor molt important en la regulació del volum cel·lular són els fluxos d'aigua a través de la membrana cel·lular. L'aigua flueix bidireccionalment per la presència d'aquaporines (Benfenati and Ferroni, 2010). A més a més, els pacients de MLC mostren un augment del contingut d'aigua en el cervell (Brockmann et al., 2003; Sener, 2003a, 2003b). Per això es va estudiar si MLC1 actuava com un canal d'aigua semblant a les aquaporines utilitzant oòcits de *Xenopus laevis* i realitzant assajos del càlcul de la permeabilitat a l'aigua (Pf) de les membranes dels oòcits un cop expressaven MLC1.

Es va voler mirar la permeabilitat a l'aigua de la proteïna MLC1 humana per si sola o acompanyada de GlialCAM humana. Per altra banda, es va voler mirar si la capacitat de transport d'aigua era dependent de l'espècie, estudiant la proteïna MLC1 de *Zebra fish*. Com a control positiu es va utilitzar la proteïna Aquaporina 1a de *Zebra fish* ja que genera transport d'aigua com a resposta a un xoc osmòtic (MacAulay and Zeuthen, 2010), i com a control negatiu es van utilitzar oòcits als quals s'havia injectat aigua (W). Es van posar els oòcits en medi hipoosmòtic i es va quantificar l'augment de volum cel·lular produït per l'entrada d'aigua per contrarestar les diferències osmòtiques. Es va mantenir el medi hipoosmòtic durant 4 minuts com a màxim i es va fotografiar cada oòcit en el temps. Aquest augment de volum respecte el temps s'utilitza per calcular la permeabilitat a l'aigua o Pf (**Figura 74**).

Cap de les condicions experimentals proposades per MLC1 provocaven un augment de la permeabilitat a l'aigua respecte els oòcits control i únicament s'observava l'efecte dels transportadors endògens de l'oòcit. En canvi, l'expressió de l'Aquaporina 1a feia augmentar molt ràpidament el volum dels oòcits i després d'un minut d'estar en contacte amb el medi hipoosmòtic, la membrana no suportava la pressió i l'oòcit rebentava.

Per tant, no es va poder identificar cap relació de MLC1 amb el transport d'aigua a través de la membrana.

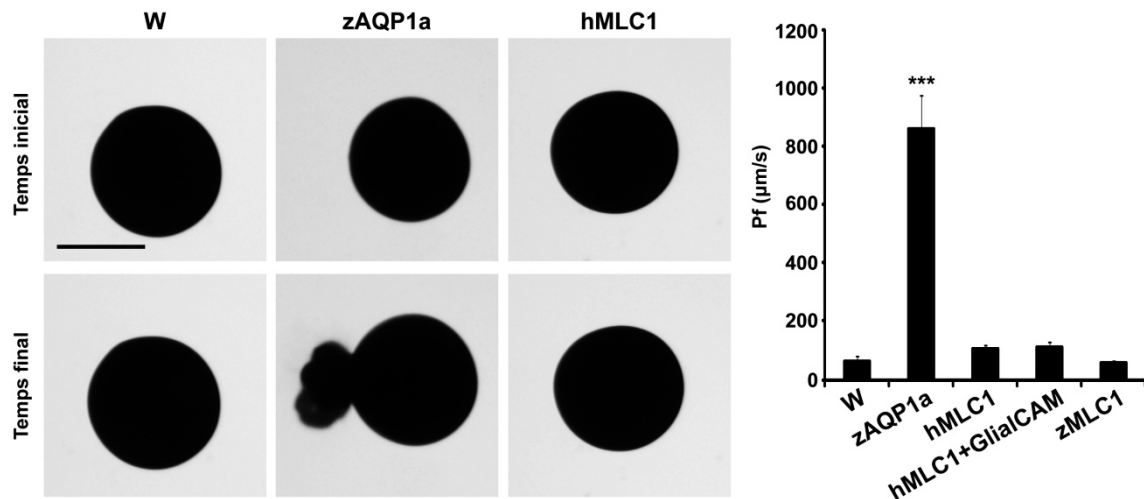


Figura 74. Càlcul de la permeabilitat osmòtica a l'aigua en oòcits de *Xenopus laevis*. Oòcits de *Xenopus* injectats amb aigua (W), aquaporina 1a de zebra fish (zAQP1a), MLC1 humana (hMLC1), MLC1 humana amb GlialCAM humana (hMLC1+GlialCAM) o MLC1 de zebra fish (zMLC1), han estat submergits en medi hiposmòtic durant 4 minuts com a màxim i se'ls ha monitoritzat el canvi de volum cel·lular mitjançant fotografies cada 5 segons durant el primer minut i cada minut fins als 4 minuts. Es mostren fotografies dels temps inicial i final del control negatiu (W), del control positiu (zAQP1a) i de MLC1 humana. També es mostra la representació dels valors de permeabilitat a l'aigua (Pf) de tots els grups experimentals. Barra, 1 mm. Dades corresponents a 3-6 experiments independents amb 10 oòcits analitzats per grup a cada experiment. *** $p < 0.001$; t-student no aparellada.

9. DISCUSSIÓ.

Mutacions en MLC1 i GlialCAM provoquen el desenvolupament de la malaltia MLC (Leegwater et al., 2001; López-Hernández et al., 2011a). Les mutacions en MLC1 presenten una expressió disminuïda i retenció al reticle endoplasmàtic (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004), mentre que algunes mutacions en GlialCAM mostren una deficiència en localitzar-se correctament a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011b). Bioquímicament, GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1, interaccionant directament i dirigint la localització d'aquesta a unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011b). També actua com a subunitat auxiliar del canal de clorur CIC-2 interaccionant directament, localitzant-lo a unions cel·lulars i modificant les propietats del canal (Jeworutzki et al., 2012). Tot i conèixer certes característiques bioquímiques, no es coneix el mecanisme fisiopatològic ni la funció d'aquestes proteïnes implicades en MLC.

L'obtenció de models cel·lulars que no presenten expressió de MLC1 o GlialCAM ha permès estudiar el mecanisme fisiopatològic i funcional *in vitro* d'aquestes dues proteïnes.

No s'ha pogut identificar la funció concreta que efectua MLC1 a les cèl·lules astrocitàries però s'ha pogut implicar en l'homeòstasi dels fluids i concretament en el procés de regulació del volum cel·lular mitjançant el mecanisme de RVD. La relació

entre MLC1 i el mecanisme de RVD és mitjançant l'activitat VRAC, ja que directa o indirectament MLC1 activa aquesta activitat. El procés de RVD és funcional ja que altres molècules implicades com l'activitat VSOAC o els canals de K^+ i Cl^- no es veuen afectats per la manca de MLC1. No obstant, la disminució de l'activitat VRAC provocada pel defecte en MLC1 provoca un cert defecte en el mecanisme de RVD que implica que hi hagi un augment del contingut d'aigua intracel·lular.

Fenotípicament, es proposa que les cèl·lules astrocitàries intenten combatre aquest augment del contingut d'aigua mitjançant l'emmagatzematge d'aquesta aigua en vacuoles intracel·lulars. S'ha pogut relacionar les vacuoles intracel·lulars aparegudes en els models astrocitaris *knock-down* amb l'augment del contingut d'aigua cel·lular o la disminució de l'activitat VRAC, ja que s'ha observat que aquestes vacuoles comparteixen un mateix origen endosomal amb vacuoles generades pel bloqueig farmacològic de l'activitat VRAC o per un tractament amb medi hipoosmòtic. A més a més, els estudis realitzats mostren la implicació de MLC1 en aquest fenotip ja que únicament quan es troba localitzada a les unions astrocitàries és quan es redueix el fenotip vacuolitzant.

S'ha identificat GlialCAM com a proteïna necessària per la correcta expressió i localització en unions astrocitàries de MLC1. L'estudi del model *knock-down* de GlialCAM ha permès descriure que MLC1 disminueix l'expressió proteica i es mostra deslocalitzat en els astròcits que per tant, també presenten una disminució de l'activitat VRAC i l'aparició de vacuoles intracel·lulars. El fet que l'absència de GlialCAM provoqui la disminució de l'expressió i la deslocalització de MLC1 explica perquè els pacients amb mutacions en *MLC1* presenten el mateix fenotip que els pacients amb mutacions en *GLIALCAM* i això explica perquè els dos models presenten les mateixes característiques fenotípiques i funcionals, apuntant novament a MLC1 com a molècula efectora.

Les mutacions en GlialCAM trobades en pacients de MLC R92W i R92Q per les quals s'ha descrit un defecte bioquímic, són capaces de recuperar els nivells d'expressió de MLC1 però són incapaces d'aconseguir una correcta localització de la proteïna a les unions astrocitàries, fet que provoca la no recuperació del defecte fenotípic. Per altra banda, no s'ha pogut identificar el tipus de defecte que provoquen altres variants mutants com GlialCAM S196Y i P148S per les quals no s'ha descrit un defecte bioquímic, ja que aconsegueixen recuperar l'expressió i la localització de MLC1 i per tant el fenotip astrocitari, comportant-se com GlialCAM *wild type*.

No s'ha pogut definir la implicació de CIC-2 en el mecanisme fisiopatològic de MLC utilitzant aquests models, ja que ni els nivells d'expressió, ni la localització, ni la funció s'han vist afectats. El què es proposa és que pot existir una certa competència entre CIC-2 i MLC1 per la interacció amb GlialCAM.

GlialCAM interacciona amb MLC1 i CIC-2, però sembla que la interacció sigui més necessària amb MLC1, ja que l'absència de GlialCAM únicament afecta l'expressió de MLC1. Per altra banda, ha d'haver-hi molècules de GlialCAM lliures en els astròcits ja que la sobreexpressió de MLC1 localitza la proteïna a les unions astrocitàries. Per tant, es proposa la hipòtesi que amb una determinada condició fisiològica o un estímul concret en un determinat tipus cel·lular o teixit, es podria desplaçar aquesta hipotètica competència a favor de CIC-2 i juntament amb les molècules lliures de GlialCAM, localitzar el canal a les unions cel·lulars. Les dades que recolzen la hipòtesi de la competència són que s'ha de combinar la sobreexpressió de GlialCAM i la manca de MLC1 per poder localitzar CIC-2 endògena a les unions astrocitàries. Si una de les dues condicions no es compleix, ja no s'observa aquest canvi de localització en el canal. Aquesta hipòtesi podria ser el principi d'un nou projecte de recerca.

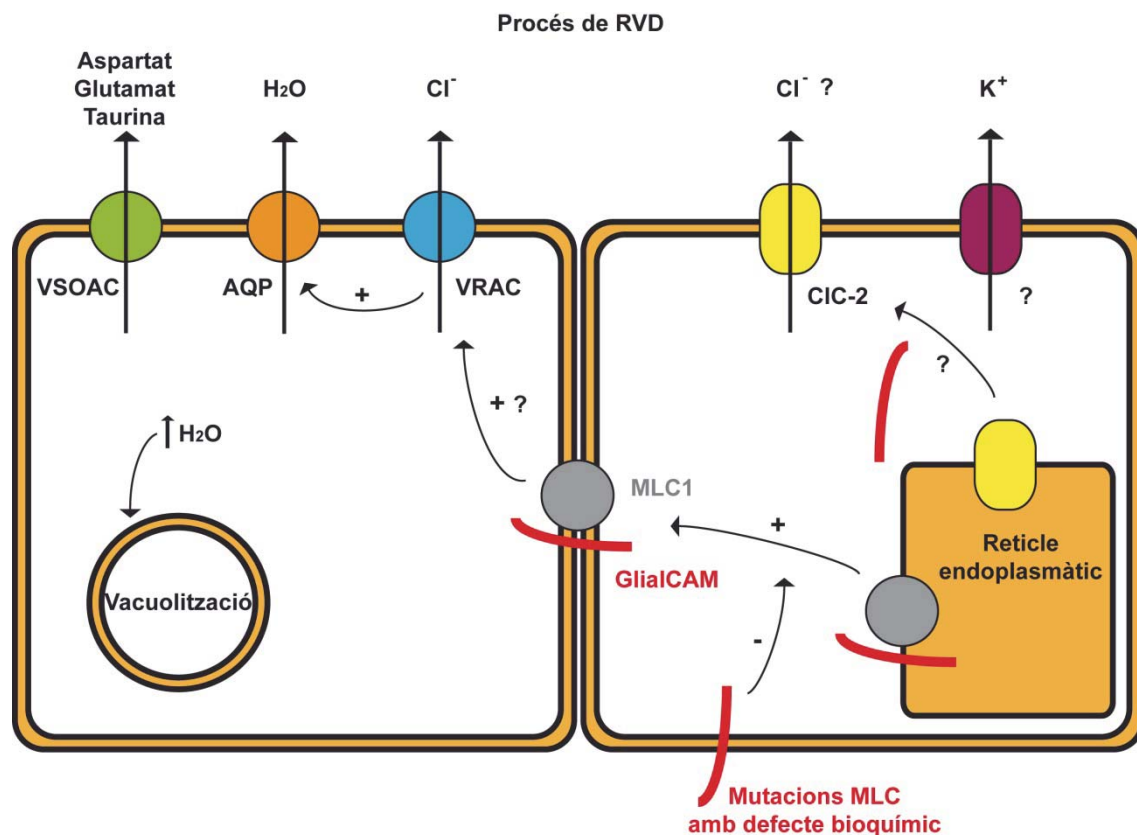


Figura 75. Representació esquemàtica de les possibles funcions de MLC1 i GlialCAM a les cèl·lules astrocitàries.

L'estudi de les mutacions de MLC1 en aquests models també obre una porta experimental al inici de la recerca d'un possible tractament pels pacients de MLC. Les dues mutacions de MLC1 estudiades es troben retingudes al reticle endoplasmàtic i els models de complementació amb aquests mutants presenten vacuolització. Estudis de coexpressió amb GlialCAM han demostrat que GlialCAM és capaç de protegir a les mutacions de MLC1 de la degradació per retenció al reticle endoplasmàtic i localitzar-les a les unions astrocitàries. Així mateix, aquests estudis han demostrat que aquestes mutacions són funcionals ja que en localitzar-se correctament a les unions astrocitàries per l'acció de GlialCAM, activen l'activitat VRAC i redueixen el fenotip vacuolitzant astrocitari. Per tant, un inici per la recerca de noves teràpies pels pacients de MLC podria ser l'activació de l'activitat VRAC o l'augment d'expressió en superfície de les variants mutants de MLC1.

En conclusió, s'ha identificat una nova funció de GlialCAM que actua com a xaperona de MLC1 i és necessària per expressar i localitzar correctament a MLC1 a les unions cel·lulars, així com pot protegir a MLC1 de la degradació per retenció al reticle endoplasmàtic.

Per altra banda, no es coneix la funció de MLC1 però s'ha descrit la seva importància com a proteïna efectora del fenotip astrocitari, relacionant la seva funció en processos de regulació del volum cel·lular com l'activitat VRAC i el mecanisme de RVD.

10. ANNEX: FIGURES COMPLEMENTÀRIES DE LA CARACTERITZACIÓ I DESENVOLUPAMENT DE MODELS CEL·LULARS *KNOCK-DOWN* DE MLC1 I GLIALCAM.

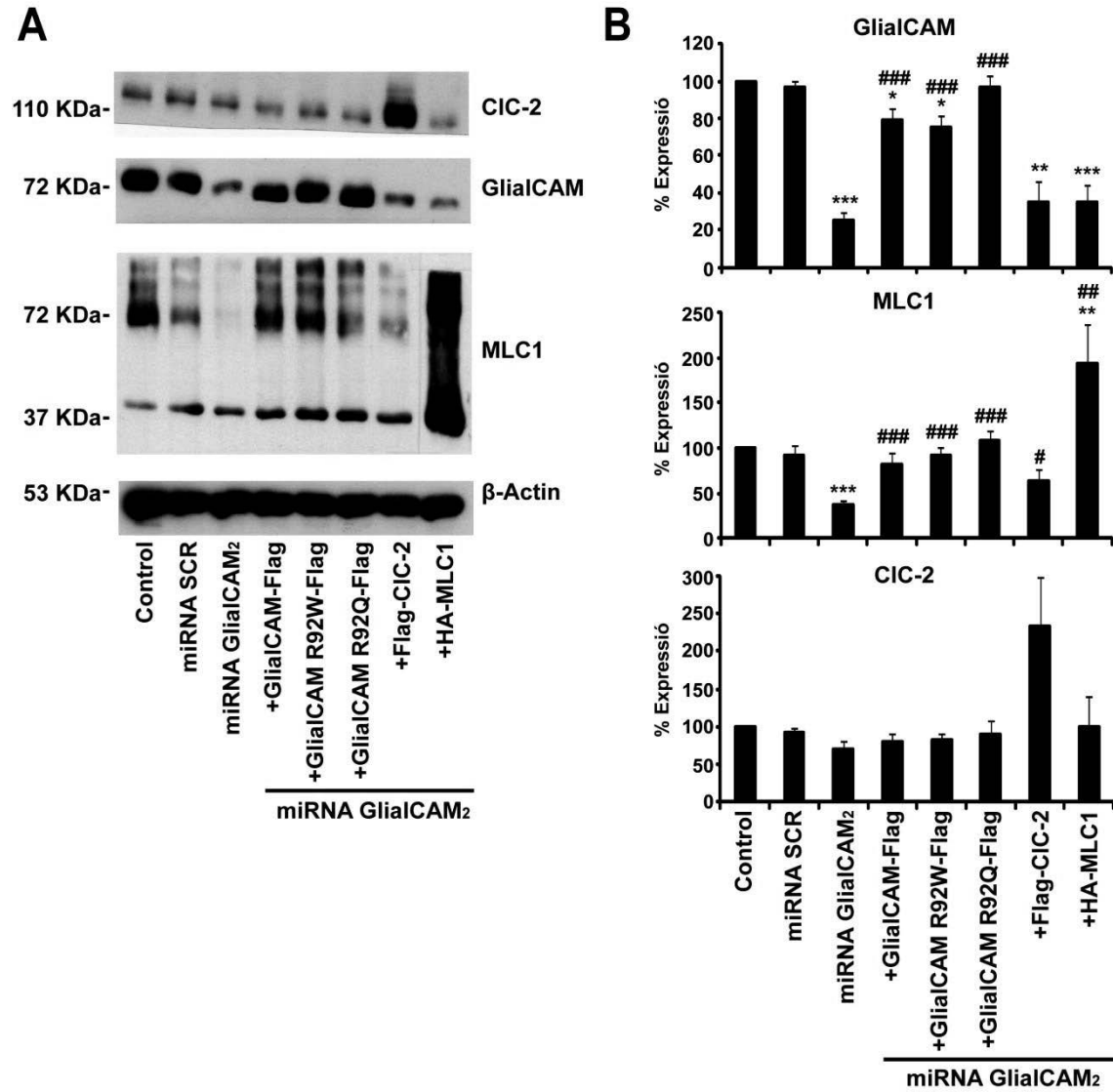


Figura 76. Caracterització dels nivells d'expressió de GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en els models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM per miRNA GlialCAM₂. **A**. Astròcits primaris de rata sense infectar (control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM₂ a MOI 10 durant 7 dies o miRNA GlialCAM₂ a MOI 10 durant 7 dies complementat amb GlialCAM-Flag, GlialCAM R92W-Flag, GlialCAM R92Q-Flag, Flag-CIC-2 o HA-MLC1 infectats a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per WB. **B**. Quantificació de l'expressió relativitzada respecte l'expressió en astròcits control. S'utilitza β -Actin com a control de càrrega. Dades corresponents als següents experiments independents: 6-14 (GlialCAM), 5-10 (MLC1) i 4-7 (CIC-2). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 respecte miRNA SCR; # p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001 respecte miRNA GlialCAM₂; t-student no aparellada.

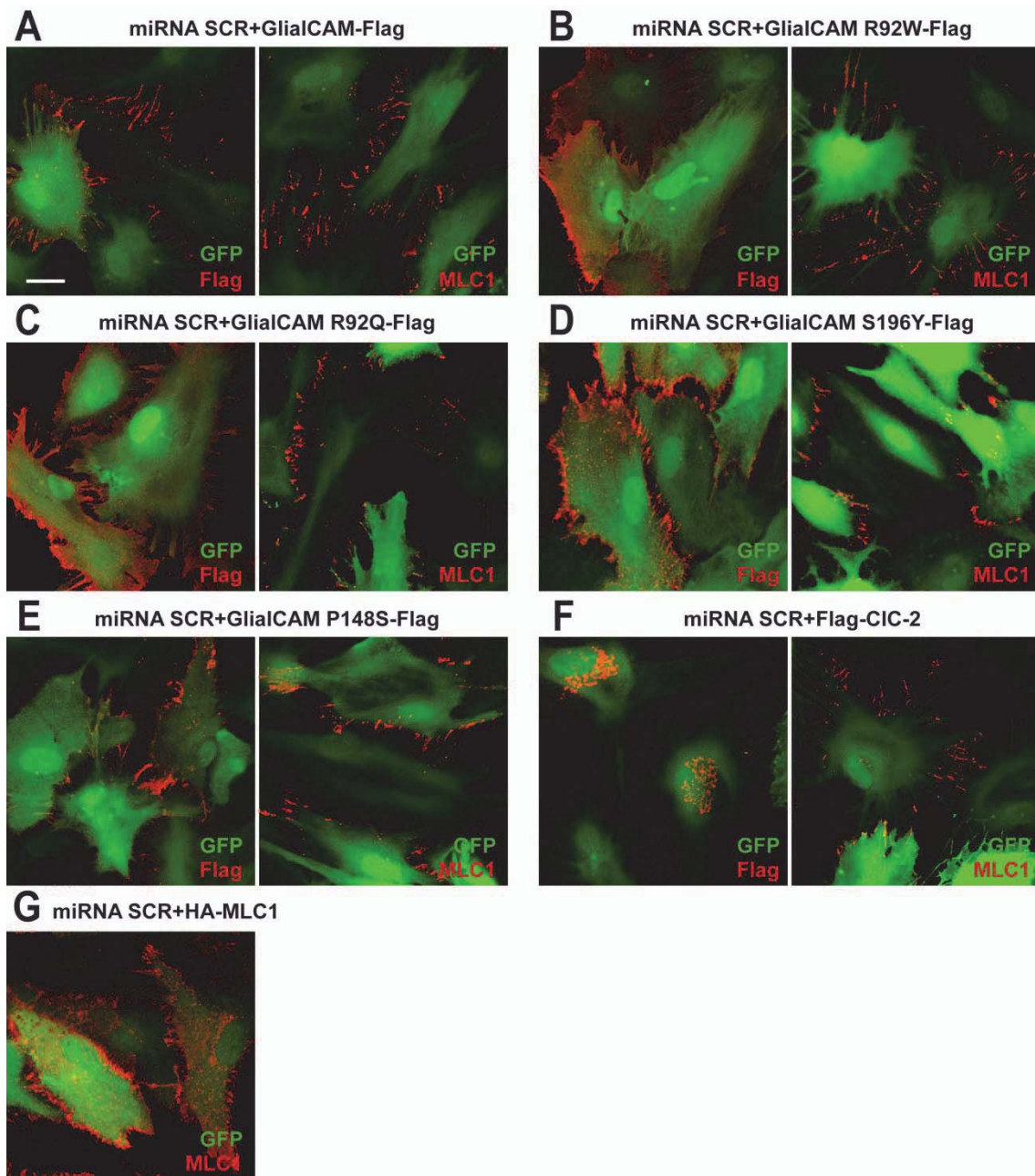


Figura 77. Estudi de localització en les complementacions del model en astròcits infectats amb miRNA SCR. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 10 durant 7 dies complementats amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (A), GlialCAM R92W-Flag (B), GlialCAM R92Q-Flag (C), GlialCAM S196Y-Flag (D), GlialCAM P148S-Flag (E), Flag-CIC-2 (F) o HA-MLC1 (G) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta cada proteïna sobreexpressada (en vermell) utilitzant un anticòs comercial contra Flag o un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 humana segons el cas. També es detecta MLC1 endògena (en vermell) utilitzant un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 de ratolí. La senyal GFP identifica els astròcits que expressen el miRNA SCR. Barra, 20 μ m. S'observa la localització a les unions astrocitàries de GlialCAM, les variants mutants S196Y i P148S i MLC1 sobreexpressada, la localització a la membrana cel·lular de les mutacions R92W i R92Q i la localització de CIC2 retinguda al voltant del nucli. MLC1 endògena presenta una correcta localització a les unions cel·lulars en totes les condicions estudiades.

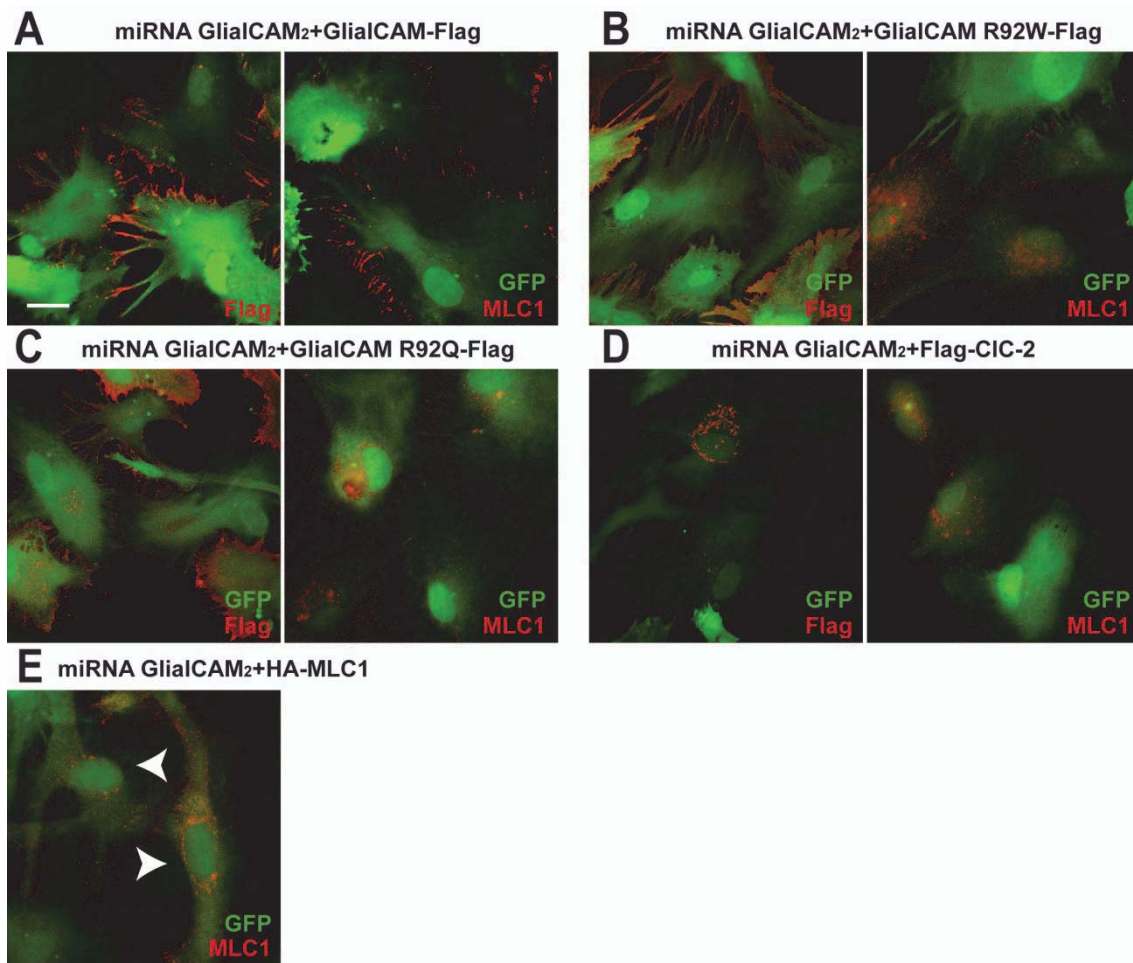


Figura 78. Estudi de localització de les complementacions del model *knock-down* de Gli3CAM generat amb el miRNA Gli3CAM2. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA Gli3CAM2 a MOI 10 durant 7 dies complementats amb adenovirus que expressen Gli3CAM-Flag (A), Gli3CAM R92W-Flag (B), Gli3CAM R92Q-Flag (C), Flag-CIC-2 (D) o HA-MLC1 (E) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta cada proteïna sobreexpressada (en vermell) utilitzant un anticòs comercial contra l'epítip Flag o un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 humana. També es detecta MLC1 endògena (en vermell) amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 de ratolí. La senyal GFP identifica els astròcits que expressen el miRNA Gli3CAM2. Barra, 20 µm. En absència de Gli3CAM endògena s'observa la recuperació de la localització de MLC1 a les unions astrocitàries per part de Gli3CAM. En canvi, ni les variants mutants de Gli3CAM R92W i R92Q ni CIC-2 recuperen la correcta localització de MLC1 mostrant-se difús per la cèl·lula. La sobreexpressió de MLC1 tampoc aconsegueix localitzar MLC1 a les unions entre astròcits en absència de Gli3CAM (fletxes blanques).

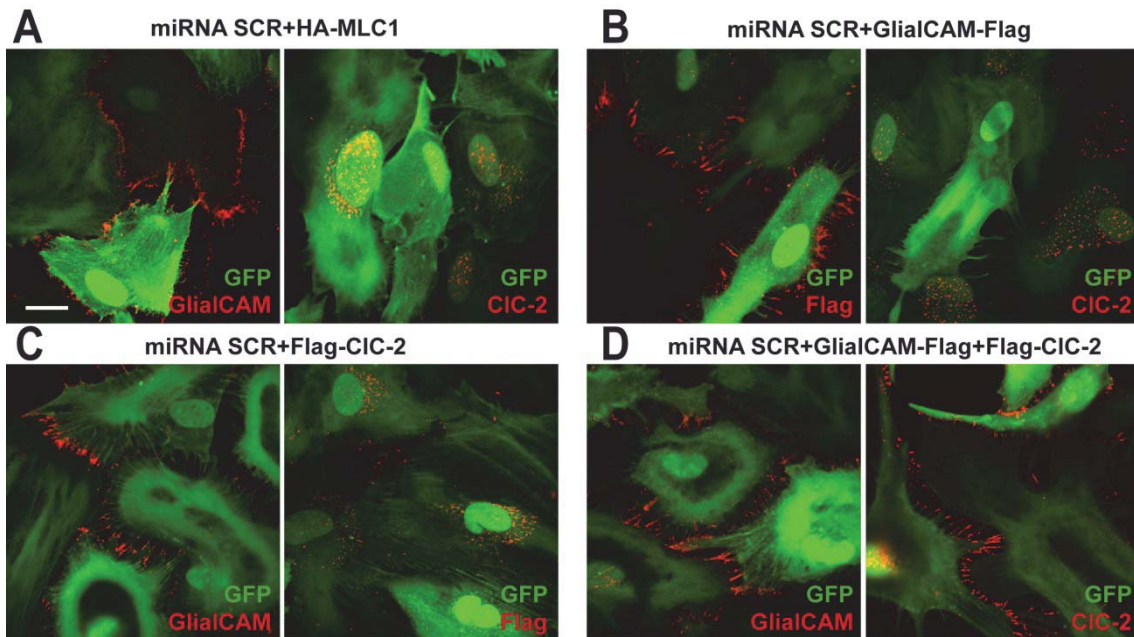


Figura 79. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 en astròcits infectats amb miRNA SCR i utilitzant les condicions de complementació que s'utilitzaran amb el model *knock-down* de MLC1. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR a MOI 5 durant 5 dies complementats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (**A**), GlialCAM-Flag (**B**), Flag-CIC-2 (**C**) o GlialCAM-Flag+Flag-CIC-2 (**D**) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta GlialCAM i CIC-2 endògenes o sobreexpressades segons la condició experimental (en vermell), amb un anticòs comercial contra Flag, un anticòs contra la part C-terminal de GlialCAM o un anticòs contra la part C-terminal de CIC-2. La senyal de GFP identifica els astròcits que expressen el miRNA SCR. Barra, 20 μ m. S'observa la localització en unions astrocitàries de GlialCAM en totes les condicions i la localització intracel·lular de CIC-2 en totes les condicions excepte en ser sobreexpressada juntament amb GlialCAM que es localitza als contactes astrocitaris.

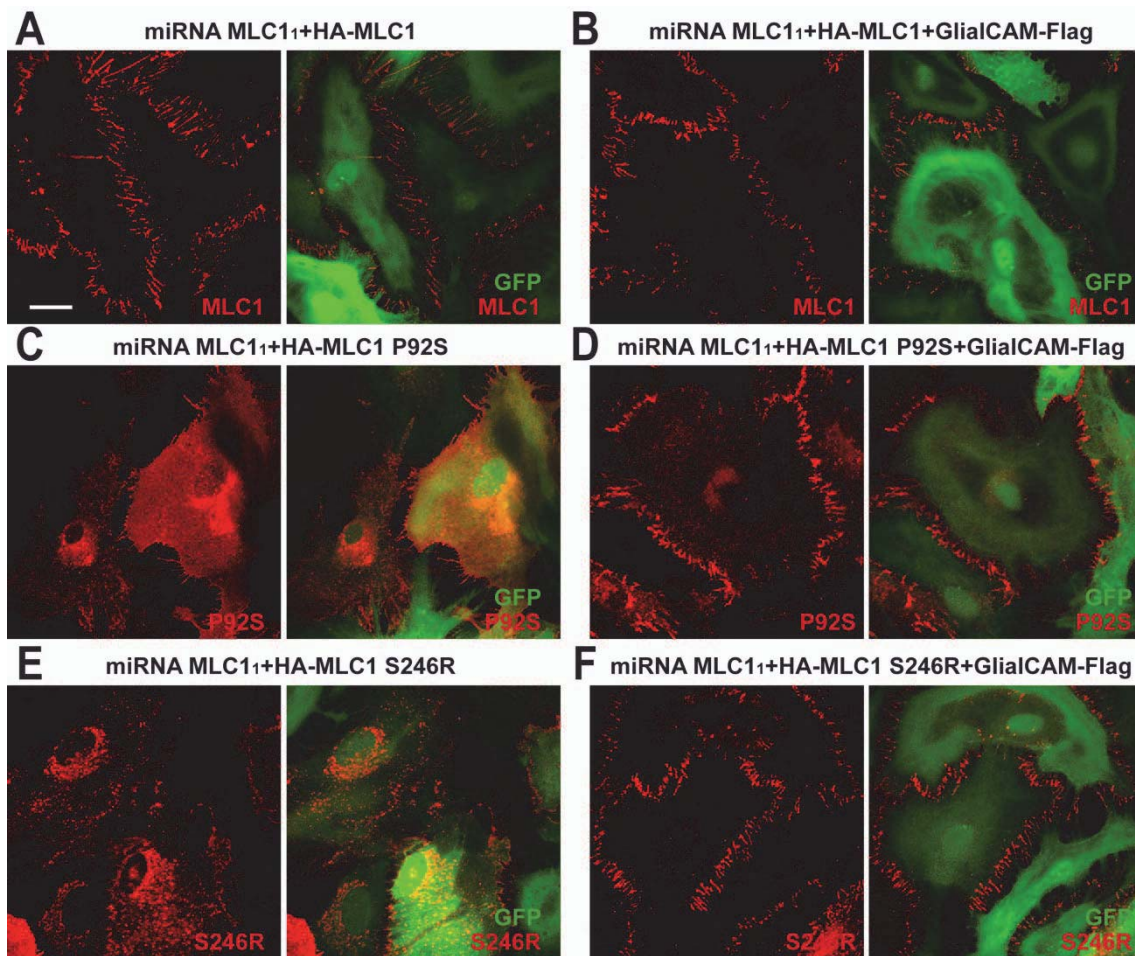


Figura 80. Estudi de la localització dels mutants de MLC1 en el model astrocitari *knock-down* de MLC1. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA MLC11 a MOI 5 durant 5 dies complementats amb adenovirus que expressen HA-MLC1 (A), HA-MLC1+GlialCAM-Flag (B), HA-MLC1 P92S (C), HA-MLC1 P92S+GlialCAM-Flag (D), HA-MLC1 S246R (E) o HA-MLC1 S246R+GlialCAM-Flag (F) a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta MLC1 *wild type* o mutant (en vermell), amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 humana. Es mostra la marca obtinguda i el *merge* amb la senyal de GFP que identifica els astròcits que expressen el miRNA MLC11. Barra, 20 μ m. S'observa la localització intracel·lular concentrada en el reticle endoplasmàtic de les mutacions P92S i S246R i la localització als contactes astrocitaris d'aquests mutants en ser coexpressats juntament amb GlialCAM.

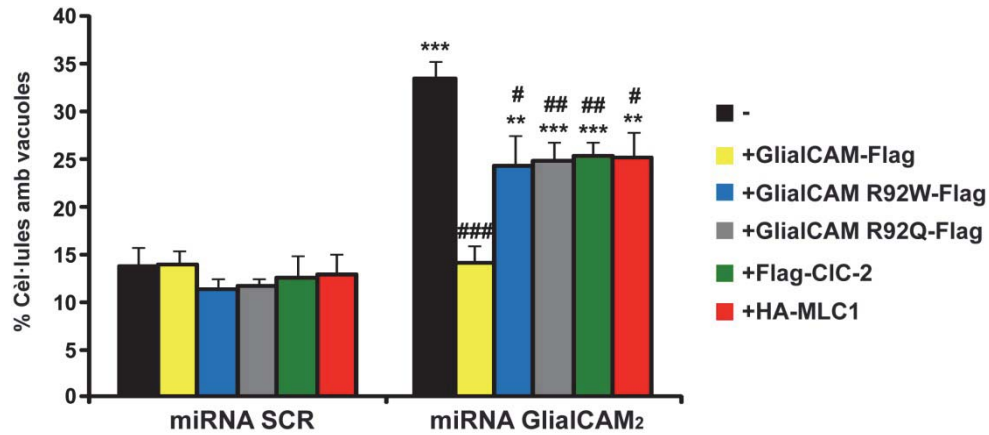


Figura 81. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM pel miRNA GlialCAM2. Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA GlialCAM2 (**negre**) a MOI 10 durant 7 dies o les respectives complementacions amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag (**groc**), GlialCAM R92W-Flag (**blau**), GlialCAM R92Q-Flag (**gris**), Flag-CIC-2 (**verd**) o HA-MLC1 (**vermell**) a MOI 2 durant 2 dies. Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major de 1µm. Dades corresponents a 5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=1483); miRNA GlialCAM2 (n=1634); miRNA SCR+GlialCAM-Flag (n=1620); miRNA GlialCAM2+GlialCAM-Flag (n=1753); miRNA SCR+GlialCAM R92W-Flag (n=1553); miRNA GlialCAM2+GlialCAM R92W-Flag (n=1781); miRNA SCR+GlialCAM R92Q-Flag (n=1510); miRNA GlialCAM2+GlialCAM R92Q-Flag (n=1898); miRNA SCR+Flag-CIC-2 (n=1338); miRNA GlialCAM2+Flag-CIC-2 (n=1813); miRNA SCR+HA-MLC1 (n=1640); miRNA GlialCAM2+HA-MLC1 (n=1820); ** p<0.01; *** p<0.001 respecte cada miRNA SCR corresponent; # p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001 respecte miRNA GlialCAM2, excloent la significació estadística dels grups control (miRNA SCR); t-student no aparellada. S'observa la recuperació del fenotip vacuolitzant únicament amb l'expressió de GlialCAM *wild type*. L'efecte observat en els altre grups pot ser degut a un efecte tòxic de la càrrega viral.

CAPÍTOL 4

**Estudis de la relació entre l'estructura i
la funció de GlialCAM.**

1. INTRODUCCIÓ.

Les molècules d'adhesió cel·lular estan implicades en molts aspectes del desenvolupament cerebral, com són els processos de migració neuronal, la formació de l'axó, la formació de les sinapsis i la formació del complex glial que rodeja als axons i a les sinapsis (Togashi et al. 2009). A més a més, també són importants per a una correcta morfologia cerebral així com per a funcions altament coordinades com la memòria i l'aprenentatge (Sanes and Lichtman, 1999; Washbourne et al., 2004; Yamagata et al., 2003).

Els contactes d'adhesió entre dues cèl·lules es poden realitzar a través d'interaccions homofíliques o a través d'interaccions heterofíliques. Aquestes molècules interactuen unes amb altres entre les diferents cèl·lules i activen una sèrie de vies de senyalització. Per això, algunes d'aquestes molècules es defineixen com molècules d'adhesió i altres com molècules de senyalització (Togashi et al. 2009). En el sistema nerviós central es troben diferents tipus de molècules d'adhesió que pertanyen a diferents famílies com ara Cadherines, Nectines i CAMs entre altres.

GlialCAM és una glicoproteïna transmembrana de tipus I amb una estructura típica de molècula d'adhesió similar a proteïnes de la família de les IgCAMs com les JAMs. Mitjançant programes informàtics, s'ha predit una regió extracel·lular de 240 aminoàcids, una regió transmembrana de 20 aminoàcids i una cua citoplasmàtica intracel·lular de 154 aminoàcids. La regió extracel·lular conté dos dominis *Ig-like*: un domini IgV de 93 aminoàcids pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 de 57 aminoàcids pròxim al domini transmembrana (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005). Per altra banda, el domini citoplasmàtic presenta un domini d'unió a PDZ de tipus III, una zona rica en prolines que putativament poden representar llocs d'unió a dominis SH3 i llocs potencials de fosforilació per les serina/treonina quinases i les tirosina quinases (Moh et al., 2005).

GlialCAM és capaç de dimeritzar formant interaccions homofíliques en *cis* (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005) i possiblement en *trans*. Presenta una localització a la membrana plasmàtica mostrant-se concentrada a les regions de contacte entre cèl·lules (López-Hernández et al., 2011a; Moh et al., 2005). Fins al moment s'han descrit dues funcions de GlialCAM associada amb altres proteïnes. S'ha descrit que actua com a subunitat β de MLC1 interaccionant fortament i provocant la concentració de MLC1 a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011a, 2011b). Per altra banda, també s'ha descrit com a subunitat auxiliar de CIC-2, interaccionant

de forma directa, localitzant el canal a les unions cel·lulars i a més a més, canviant les característiques d'activació i rectificació del canal (Jeworutzki et al., 2012).

En aquest capítol es pretén avançar en el coneixement bioquímic i estructural de GlialCAM a partir d'estudis d'estructura-funció. S'han fet estudis per identificar les regions implicades en l'homo-interacció i la localització de GlialCAM, així com identificar els dominis implicats en l'hetero-interacció entre GlialCAM i MLC1 o CIC-2. A més a més, s'han realitzat estudis per descriure la possible interacció en *trans* de la molècula.

Per desenvolupar el projecte d'estructura-funció es van realitzar estudis d'expressió, interacció, localització i funció. En primer lloc, es va estudiar l'efecte que provocaven algunes delecions del domini extracel·lular i citoplasmàtic de GlialCAM en aquestes funcions. Posteriorment, es va seguir una aproximació més fina utilitzant proteïnes quimèriques on s'intercanviava els dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM amb els d'altres proteïnes.

Per portar a terme els estudis d'expressió, localització i funció, es van fusionar 3 epítops Flag a l'extrem C-terminal de cadascuna de les proteïnes quimèriques i es van clonar en el vector destí d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA3 i en el vector destí pCS que permet obtenir cRNA per realitzar assajos de *voltage clamp*. Per realitzar els estudis d'interacció es va utilitzar el mètode de Split-TEV. Per això, es va fusionar a cadascuna de les construccions quimèriques el fragment TEV-C i es van clonar al vector destí d'expressió pcDNA6.2 sota el control del promotor TK. Totes les construccions es van realitzar mitjançant la metodologia *Gateway* (Invitrogen).

2. ESTUDIS DE LES DELECIONS DE GLIALCAM.

Es van generar diverses delecions a la proteïna GlialCAM. Concretament es van realitzar tres delecions al domini extracel·lular i tres delecions al domini citoplasmàtic (**Figura 82**). La nomenclatura per identificar les diferents delecions va ser la següent:

Glial Δ Nt: Deleció de tot el domini extracel·lular.

Glial Δ IgV: Deleció del domini IgV.

Glial Δ IgC2: Deleció del domini IgC2.

Glial Δ Ct: Deleció de tot el domini citoplasmàtic.

Glial Δ Ser331: Deleció d'un fragment del domini citoplasmàtic, acabant la proteïna a l'aminoàcid Serina 331.

GlialΔAla398: Deleció d'un fragment del domini citoplasmàtic, acabant la proteïna a l'aminoàcid Alanina 398.

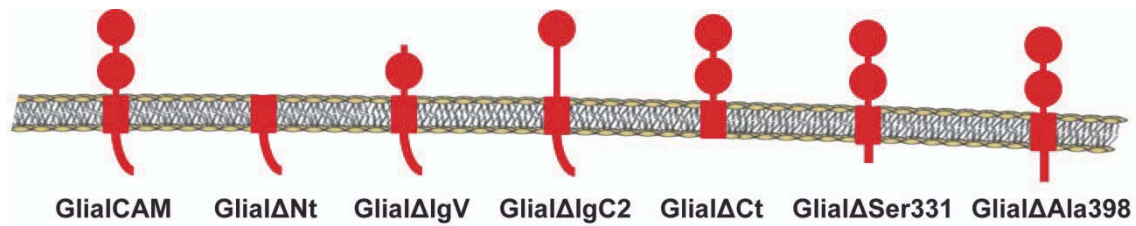


Figura 82. Representació esquemàtica de les deleccions de GlialCAM. Esquema representatiu de les deleccions efectuades a GlialCAM. Es mostra l'esquema de la proteïna sencera i de cadascuna de les 6 deleccions generades als dominis extracel·lular i citoplasmàtic.

Els estudis de localització de la delecció del domini extracel·lular (GlialΔNt) van ser realitzats per la Dra. Tania López.

2.1. Caracterització de l'expressió i localització de les deleccions de GlialCAM.

Es van transfectar cèl·lules HeLa i es van estudiar els nivells d'expressió per WB utilitzant un anticòs contra l'epítip Flag per poder comparar els nivells d'expressió entre les diferents construccions (**Figura 83**).



Figura 83. Caracterització dels nivells d'expressió de les deleccions de GlialCAM. Cèl·lules HeLa transfectades amb les deleccions de GlialCAM fusionades a l'epítip Flag, analitzades per WB. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag i la detecció de β-Actin com a control de càrrega. Es mostra l'esquema representatiu de cada delecció.

Es va observar que les deleccions del domini extracel·lular provocaven una disminució dels nivells d'expressió de la proteïna. Aquesta disminució era molt important en el cas d'eliminar el domini extracel·lular sencer o el domini IgV.

Seguidament es va estudiar la localització de les delecions i la capacitat de localitzar-se a les unions cel·lulars mitjançant *intensity profile* (Figura 84). Es va observar que la delecio del domini extracel·lular provocava la retencio citoplasmàtica de la proteïna, mentre que les delecions dels dominis IgV i IgC2 localitzaven la proteïna a la membrana cel·lular però no mostrava una concentració a les unions cel·lulars. S'observava aquest mateix efecte amb la delecio del domini citoplasmàtic. Únicament les delecions Ser331 i Ala398 eren capaces de localitzar-se en cert grau a les unions cel·lulars (Figura 84, fletxes).

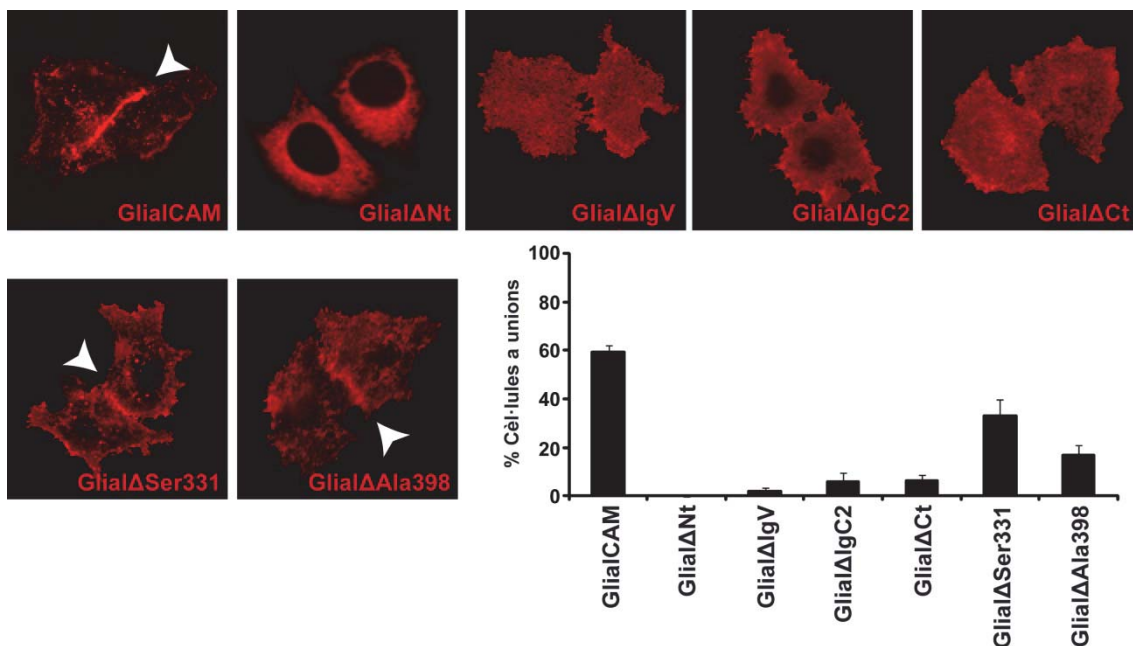


Figura 84. Localització de les delecions de GlialCAM. Cèl·lules HeLa transfectades amb les delecions de GlialCAM fusionades a l'epítot Flag, analitzades per immunofluorescència. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag. Es mostra la localització concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 3-9 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM (n=449); GlialΔNt (n=124); GlialΔIgV (n=354); GlialΔIgC2 (n=310); GlialΔCt (n=459); GlialΔSer331 (n=407); GlialΔAla398 (n=440).

2.2. Caracterització de la interacció de les delecions de GlialCAM.

Es van estudiar els dominis implicats en l'homodimerització en *cis* de GlialCAM i en l'heterodimerització en *cis* de GlialCAM amb MLC1 i CIC-2 mitjançant el mètode Split-TEV. Es van realitzar els assajos de luminescència per validar aquestes interaccions amb les delecions de GlialCAM (Figura 85).

Les delecions del domini citoplasmàtic no provocaven cap defecte en les tres interaccions estudiades. Per altra banda, les delecions del domini extracel·lular sencer o del domini IgV provocaven una disminució significativa tant de l'homodimerització de GlialCAM com de la interacció amb MLC1 i CIC-2. La delecio del domini IgC2 no

presentava un defecte significatiu en les interaccions estudiades però mostrava una tendència a reduir la senyal d'interacció.

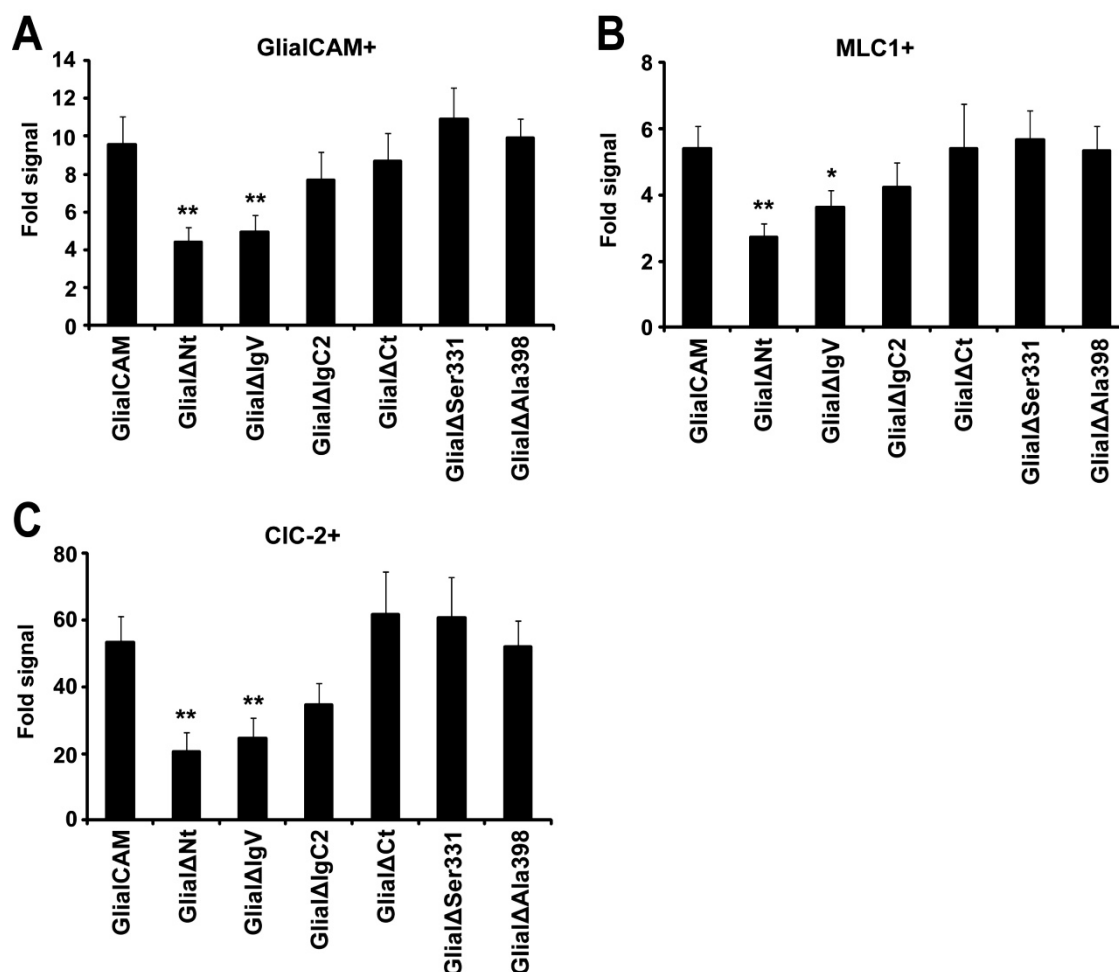


Figura 85. Estudis d'interacció de les deleccions de GlialCAM. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre GlialCAM i les deleccions de GlialCAM. Dades corresponents a 13 experiments independents. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre MLC1 i les deleccions de GlialCAM. Dades corresponents a 9 experiments independents. **C.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre CIC-2 i les deleccions de GlialCAM. Dades corresponents a 8 experiments independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecte la senyal obtinguda amb GlialCAM; t-student no aparellada.

Per tant, es va implicar el domini extracel·lular i en particular el domini IgV en l'homodimerització de GlialCAM i en l'heterodimerització entre GlialCAM i MLC1 o CIC-2. No obstant, altres dominis podien estar implicats en aquestes interaccions ja que les deleccions del domini extracel·lular no eliminaven per complet la senyal d'interacció.

2.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les deleccions de GlialCAM.

Es van realitzar assajos d'immunofluorescència en cèl·lules HeLa cotransfectades amb les deleccions de GlialCAM i MLC1 o CIC-2. Posteriorment, es va analitzar el

percentatge de cèl·lules que mostraven una localització de MLC1 o CIC-2 a les unions cel·lulars mitjançant l'anàlisi de l'*intensity profile*.

L'estudi de la localització de MLC1 (**Figura 86**) va mostrar que totes les delecions del domini extracel·lular que presentaven defectes en localitzar-se a les unions cel·lulars i a la vegada presentaven defectes en la interacció amb MLC1 eren incapaces de localitzar MLC1 a les unions.

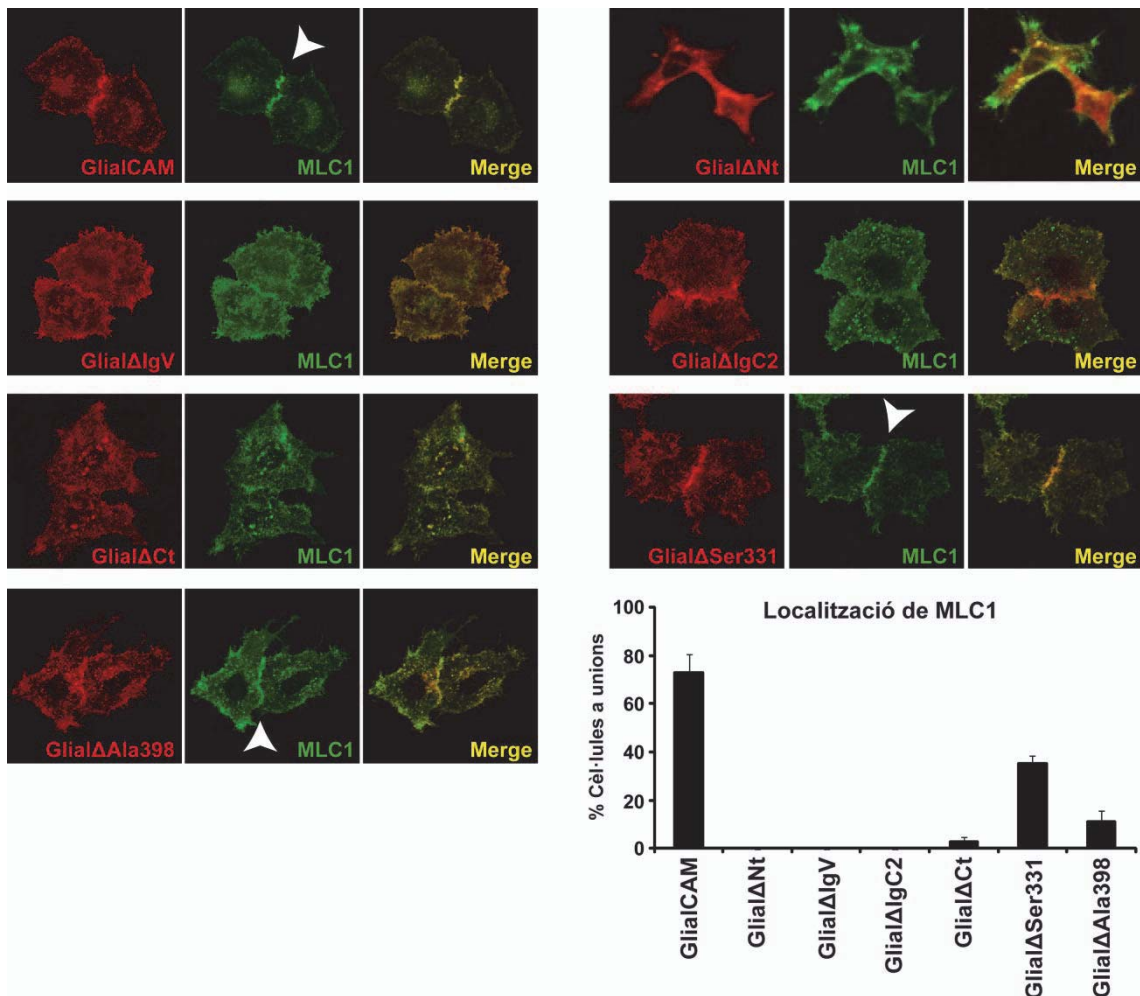


Figura 86. Colocalització de MLC1 i les delecions de GlialCAM. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb MLC1 i cadascuna de les delecions de GlialCAM fusionades a l'epítot Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada delecio (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de MLC1 (en verd) amb un anticòs policlonal contra MLC1. Es mostra la localització de MLC1 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 4-8 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+MLC1 (n=161); GlialΔNt+MLC1 (n=116); GlialΔIgV+MLC1 (n=174); GlialΔIgC2+MLC1 (n=140); GlialΔCt+MLC1 (n=224); GlialΔSer331+MLC1 (n=202); GlialΔAla398+MLC1 (n=188).

Per altra banda, la delecio del domini citoplasmàtic era capaç d'interaccionar bioquímicament amb MLC1, però al no localitzar-se a les unions cel·lulars tampoc hi localitzava MLC1. Les delecions Ser331 i Ala398 eren les úniques que aconseguien

concentrar en cert grau MLC1 a les unions cel·lulars i a la vegada no mostraven cap defecte d'interacció amb aquesta (**Figura 86, fletxes**).

L'estudi de la localització de CIC-2 (**Figura 87**) va mostrar algunes diferències respecte MLC1.

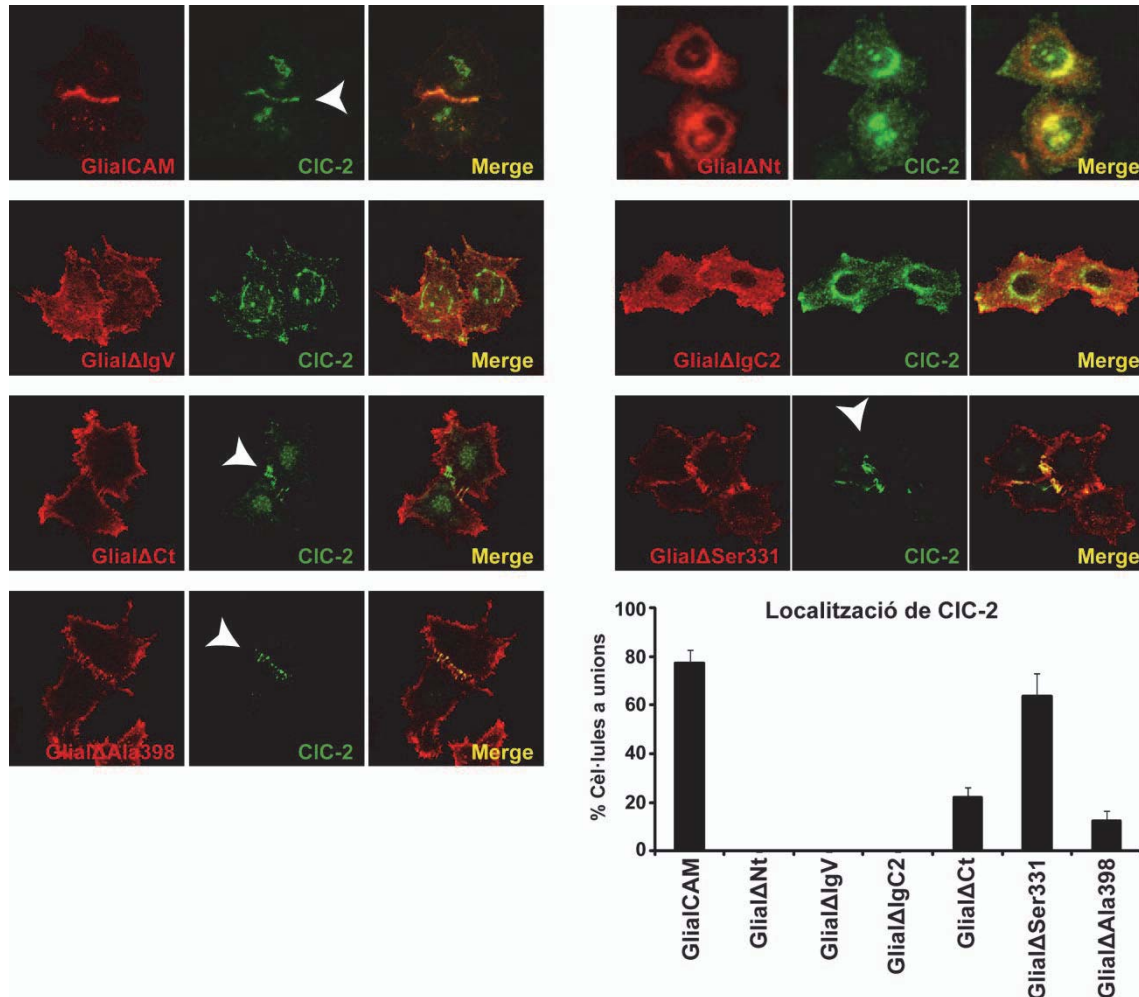


Figura 87. Colocalització de CIC-2 i les deleccions de GlialCAM. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb CIC-2 i cadascuna de les deleccions de GlialCAM fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada delecció (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de CIC-2 (en verd) amb un anticòs policlonal contra CIC-2. Es mostra la localització de CIC-2 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 4-10 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+CIC-2 (n=167); GlialΔNT+CIC-2 (n=77); GlialΔIgV+CIC-2 (n=160); GlialΔIgC2+CIC-2 (n=155); GlialΔCt+CIC-2 (n=112); GlialΔSer331+CIC-2 (n=173); GlialΔAla398+CIC-2 (n=108).

Les deleccions del domini extracel·lular tampoc localitzaven CIC-2 a les unions cel·lulars degut al defecte d'interacció i localització. En canvi, les deleccions Ser331 i Ala398 que no presentaven aquests defectes, localitzaven CIC-2 a les unions cel·lulars (**Figura 87, fletxes**). En aquest cas però, CIC-2 també es localitzava a les unions cel·lulars en ser cotransfectat amb la delecció del domini citoplasmàtic sencer de

GlialCAM. Aquests resultats sorprenents indicaven que CIC-2 es localitzava a les unions sense la necessitat que GlialCAM hi estigués localitzada, ja que aquesta deleció no es localitzava per si sola als contactes cel·lulars.

2.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les deleccions de GlialCAM.

Es va realitzar l'estudi funcional dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per GlialCAM amb les deleccions construïdes mitjançant assajos de *voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* i de *patch clamp* en cèl·lules HEK.

Els assajos funcionals es van realitzar en col·laboració amb el grup del Dr. Michael Pusch del Institut de Biofísica de Gènova.

Es va fer un estudi electrofisiològic de la cinètica de desactivació del canal CIC-2 a +60 mV, comparant la intensitat de la corrent obtinguda en l'estat d'equilibri (*steady state*) respecte la màxima intensitat obtinguda, després d'un pols prolongat hiperpolaritzant de -140 mV (**Figura 88**). Aquesta relació era petita quan s'expressava el canal CIC-2 per si sol, i augmentava considerablement a les corrents obtingudes amb la coexpressió de CIC-2 juntament amb GlialCAM.

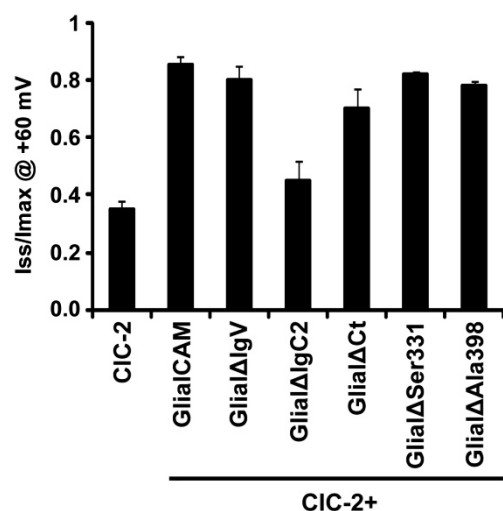


Figura 88. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les deleccions de GlialCAM. Estudis de *voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* que expressen CIC-2 sol, CIC-2+GlialCAM o CIC-2+cadauna de les deleccions de GlialCAM. Es representa la cinètica del canal a +60 mV calculada amb la relació entre la corrent obtinguda a *steady state* i la corrent màxima. Dades corresponents a 6 experiments independents com a mínim amb cada constructe. La deleció GlialΔNt es troba en estudi.

Es va observar que la deleció del domini IgC2 gairebé no produïa canvis en les corrents de CIC-2, mentre que les altres deleccions generaven els mateixos canvis en l'activitat del canal que GlialCAM sencera. Aquests resultats es van reproduir realitzant *patch clamp* en cèl·lules HEK transfectades amb els mateixos grups experimentals (dades no mostrades).

2.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les deleccions de GlialCAM.

Els estudis realitzats amb les deleccions de GlialCAM impliquen el domini extracel·lular de la proteïna en l'expressió, la localització i l'homodimerització de GlialCAM. Aquest domini també està implicat en la interacció de GlialCAM amb MLC1 i CIC-2 prenent més importància el domini IgV. En el cas de la localització a les unions cel·lulars de la proteïna, també és necessària la presència del domini citoplasmàtic.

La capacitat intrínseca de GlialCAM a localitzar-se a les unions cel·lulars juntament amb la interacció bioquímica amb MLC1 o CIC-2, són les característiques necessàries per localitzar MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars. En el cas particular de CIC-2 hi ha evidències que també és capaç de localitzar-se a les unions sense necessitar la localització de GlialCAM. Funcionalment, el domini IgC2 podria estar implicat en els canvis funcionals de CIC-2.

Domini	Deleccions GlialCAM
Extracel·lular	Afecta interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització G / M / C Funció ?
Transmembrana	?
Citoplasmàtic	No afecta interacció Afecta localització G / M / C (menor) No afecta funció

Figura 89. Resum dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. Taula resum on s'ha diferenciat els dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM i on es mostra els processos en els quals estan implicats aquests dominis segons els estudis realitzats amb les deleccions de GlialCAM. G:GlialCAM, M:MLC1, C:CIC-2.

3. ESTUDIS DE LES PROTEÏNES QUIMÈRIQUES GLIALCAM-TAC.

Per seguir els estudis dels dominis de GlialCAM es va realitzar una aproximació més acurada com és la generació de proteïnes quimèriques. Aquestes quimeres podien introduir dades noves ja que permetien estudiar cada domini per separat i a més a més, així es podria estudiar el domini transmembrana.

Per la generació de les quimeres es va utilitzar una proteïna no relacionada amb GlialCAM i habitualment utilitzada en la construcció de quimeres com és la proteïna TAC.

TAC o receptor d'interleuquina 2 (IL-2R) és una proteïna que s'uneix a la citoquina interleuquina 2 (IL-2) i per tant està involucrada en la proliferació dels limfòcits B i T entre altres funcions. Estructuralment és una proteïna de membrana tipus I de 272 aminoàcids formada per un domini extracel·lular, un domini transmembrana i una petita cua citoplasmàtica. El domini extracel·lular presenta el pèptid senyal a l'extrem

N-terminal i dos dominis *Sushi* (D1 i D2) que formen dos o tres ponts disulfur entre ells i que són els responsables de la interacció amb la interleuquina 2. A més a més, presenta llocs putatius de N-glicosilació així com una zona rica en prolines i treonines important per la funció. El domini transmembrana de 20 aminoàcids forma un sol pas transmembrana i la cua citoplasmàtica consta únicament de 12 aminoàcids amb dos llocs putatius de fosforilació, però no mostra cap implicació en la senyalització funcional de la molècula (Bodnár et al., 2008; Giri et al., 1995).

Per a la construcció de les quimeres GlialCAM-TAC es va decidir separar el domini extracel·lular, el domini transmembrana i el domini citoplasmàtic de les dues proteïnes i construir proteïnes quimèriques amb totes les combinacions possibles (**Figura 90**). En aquest cas però, la combinació quimèrica de GlialCAM extracel·lular i transmembrana amb TAC citoplasmàtic no es va construir ja que es va considerar que la petita cua citoplasmàtica de TAC no influïa funcionalment. Enlloc d'aquesta combinació, es va construir una proteïna quimèrica que contenia el domini extracel·lular i citoplasmàtic de TAC juntament amb el domini transmembrana de GlialCAM i la petita regió extracel·lular que uneix el domini IgC2 amb el domini transmembrana. Es va decidir incloure aquesta regió perquè regions similars a aquesta estan implicades en la interacció entre molècules del sistema immunològic.

Per poder identificar en tot moment quins dominis eren els presents en cada quimera construïda, es va utilitzar una nomenclatura de 3 lletres que identifiquen la proteïna d'origen de cada domini ordenadament. Així, GlialCAM es representa amb una **G** i TAC amb una **T**. Pel que fa a l'ordre, la primera lletra correspon al domini extracel·lular, la segona lletra al domini transmembrana i la tercera lletra al domini citoplasmàtic.

Les sis quimeres GlialCAM-TAC construïdes van ser les següents:

1. **G-T-T**: Formada pels dominis transmembrana i citoplasmàtic de TAC i l'extracel·lular de GlialCAM.
2. **T-T-G**: Formada pels dominis extracel·lular i transmembrana de TAC i el citoplasmàtic de GlialCAM.
3. **G-T-G**: Formada pels dominis extracel·lular i citoplasmàtic de GlialCAM i el transmembrana de TAC.
4. **T-G-T**: Formada pels dominis extracel·lular i citoplasmàtic de TAC i el transmembrana de GlialCAM.

5. **Tg-G-T**: Formada pels dominis extracel·lular i citoplasmàtic de TAC i la regió que comença al final del domini IgC2 i inclou el transmembrana de GlialCAM.
6. **T-G-G**: Formada pels dominis transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM i l'extracel·lular de TAC.

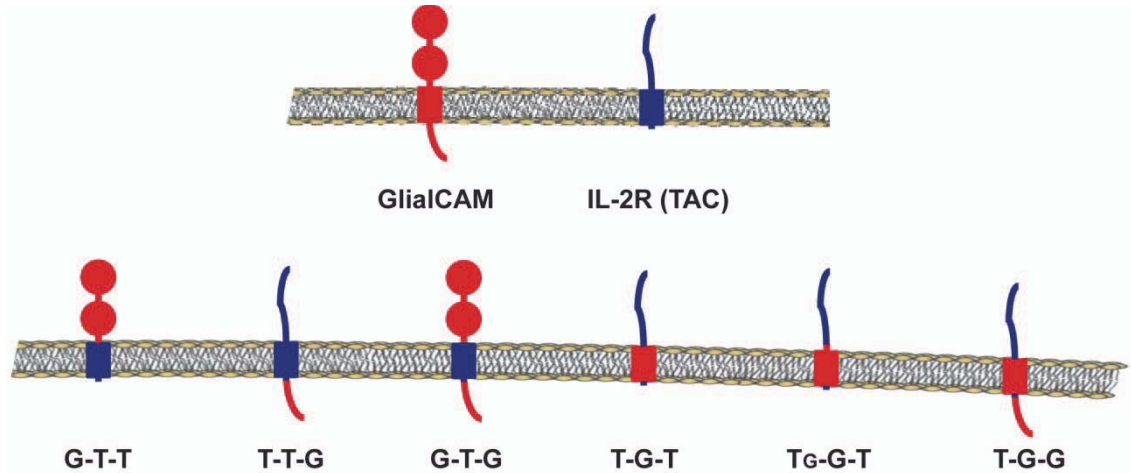


Figura 90. Representació esquemàtica de les quimeres GlialCAM-TAC. Esquema representatiu de GlialCAM, TAC i les quimeres construïdes a partir de la combinació dels dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de les dues proteïnes. Es mostra la nomenclatura utilitzada per identificar cada quimera.

3.1. Caracterització de l'expressió i localització de les quimeres GlialCAM-TAC.

Es van transfectar cèl·lules HeLa i es van estudiar els nivells d'expressió per WB utilitzant un anticòs contra l'epítip Flag (**Figura 91**).

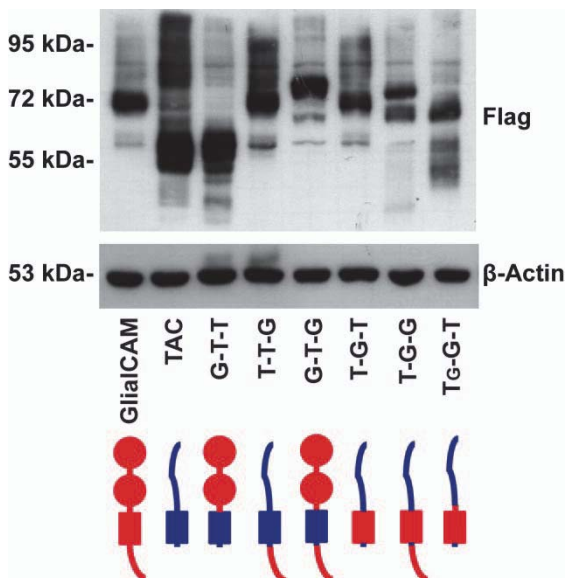


Figura 91. Caracterització dels nivells d'expressió de les quimeres GlialCAM-TAC. Cèl·lules HeLa transfectades amb les quimeres GlialCAM-TAC fusionades a l'epítip Flag, analitzades per WB. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag i la detecció de β -Actin com a control de càrrega. Es mostra l'esquema representatiu de cada quimera.

Es va observar que la proteïna TAC tenia uns nivells d'expressió comparables als nivells d'expressió de GlialCAM i que totes les quimeres construïdes a partir d'aquestes dues proteïnes presentaven uns bons nivells d'expressió.

L'estudi de la localització d'aquestes quimeres mitjançant *intensity profile* (Figura 92) va mostrar que ni el domini extracel·lular ni el domini citoplasmàtic de GlialCAM per si sols eren capaços de localitzar les proteïnes als contactes entre cèl·lules. Únicament es va observar la localització a les unions cel·lulars de la quimera G-T-G que tenia els dominis extracel·lular i citoplasmàtic de GlialCAM a la vegada. Per altra banda, es va observar que el domini transmembrana no influïa en la localització a les unions cel·lulars amb la localització de la mateixa quimera G-T-G.

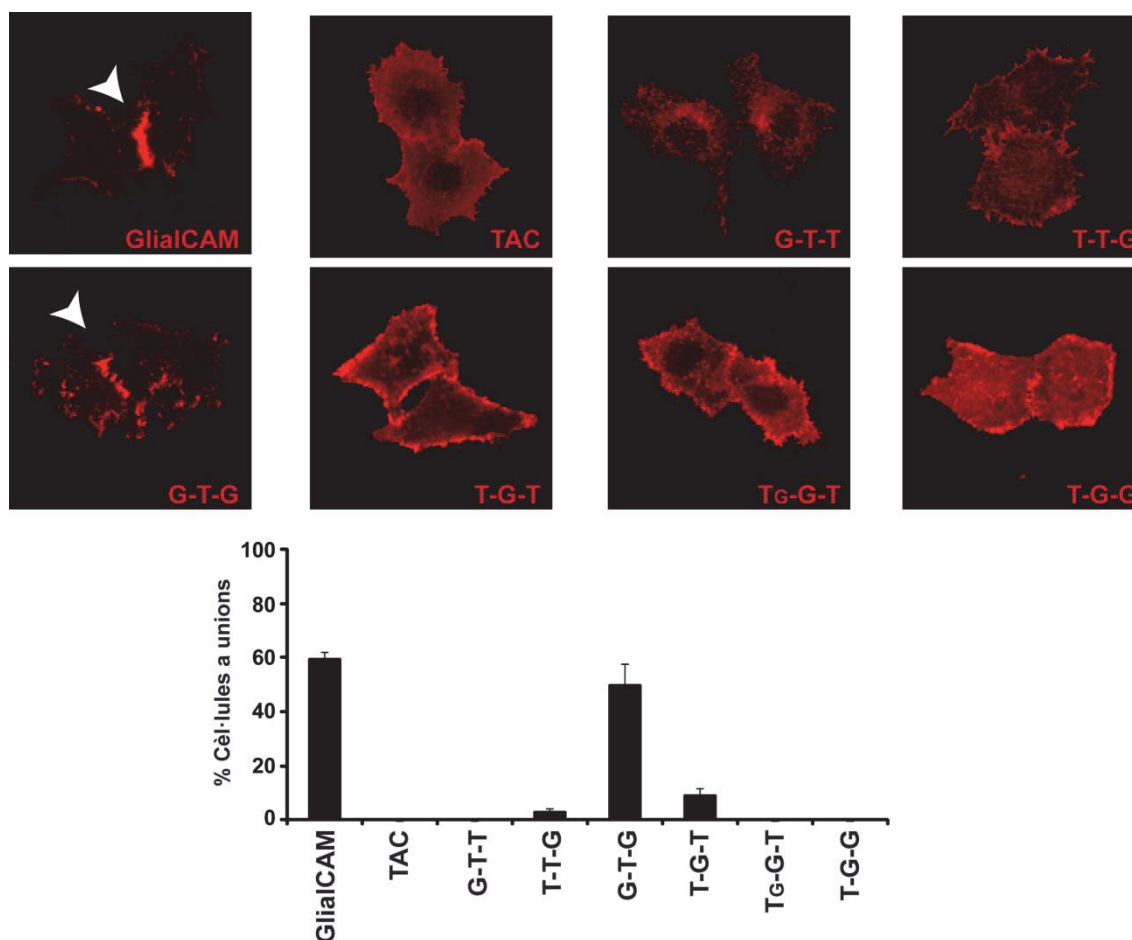


Figura 92. Localització de les quimeres GlialCAM-TAC en cèl·lules HeLa. Cèl·lules HeLa transfectades amb les quimeres GlialCAM-TAC fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag. Es mostra la localització concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 6-12 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM (n=449); TAC (n=585); G-T-T (n=531); T-T-G (n=742); G-T-G (n=684); T-G-T (n=534); Tg-G-T (n=366); T-G-G (n=638).

3.2. Caracterització de la interacció de les quimeres GlialCAM-TAC.

Es van validar les interaccions GlialCAM-GlialCAM, GlialCAM-MLC1 i GlialCAM-CIC-2 pel mètode Split-TEV, realitzant assajos de luminescència amb les quimeres GlialCAM-TAC (Figura 93).

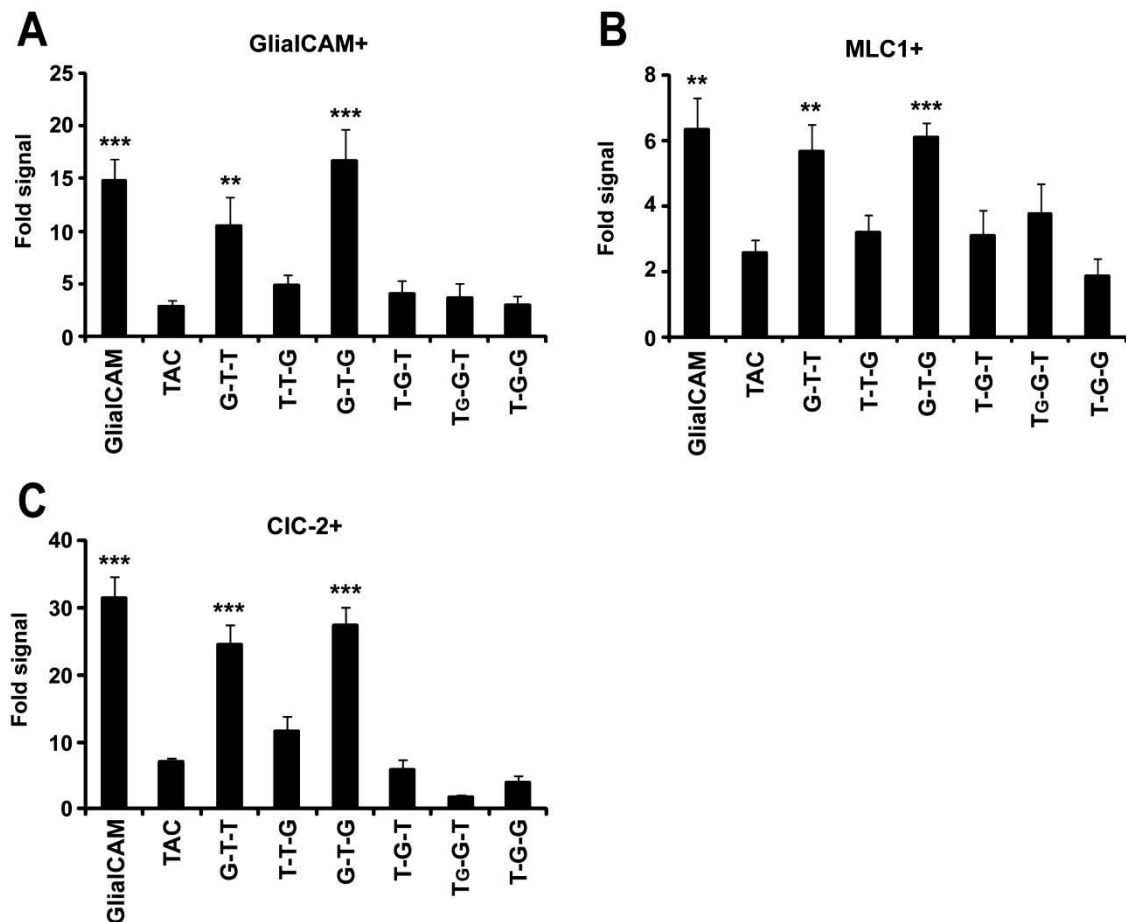


Figura 93. Estudis d'interacció de les quimeres GlialCAM-TAC. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre GlialCAM i les quimeres GlialCAM-TAC. Dades corresponents a 8-18 experiments independents. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre MLC1 i les quimeres GlialCAM-TAC. Dades corresponents a 12-19 experiments independents. **C.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre CIC-2 i les quimeres GlialCAM-TAC. Dades corresponents a 6-12 experiments independents. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecte la senyal obtinguda amb TAC; t-student no aparellada.

Amb l'estudi de les quimeres es va relacionar clarament el domini extracel·lular de GlialCAM tant en l'homodimerització de la proteïna com amb l'heterodimerització amb MLC1 i CIC-2, ja que únicament s'observaven diferències significatives respecte la senyal obtinguda amb la proteïna TAC (control negatiu) quan la quimera contenia aquest domini.

3.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les quimeres GlialCAM-TAC.

Es van realitzar assajos d'immunofluorescència en cèl·lules HeLa cotransfectades amb les quimeres GlialCAM-TAC i MLC1 o CIC-2.

En analitzar el percentatge de cèl·lules que mostraven una localització de MLC1 a les unions cel·lulars mitjançant l'anàlisi de l'*intensity profile* (Figura 94), es va observar que l'única quimera que localitzava MLC1 a les unions cel·lulars era la quimera G-T-G.

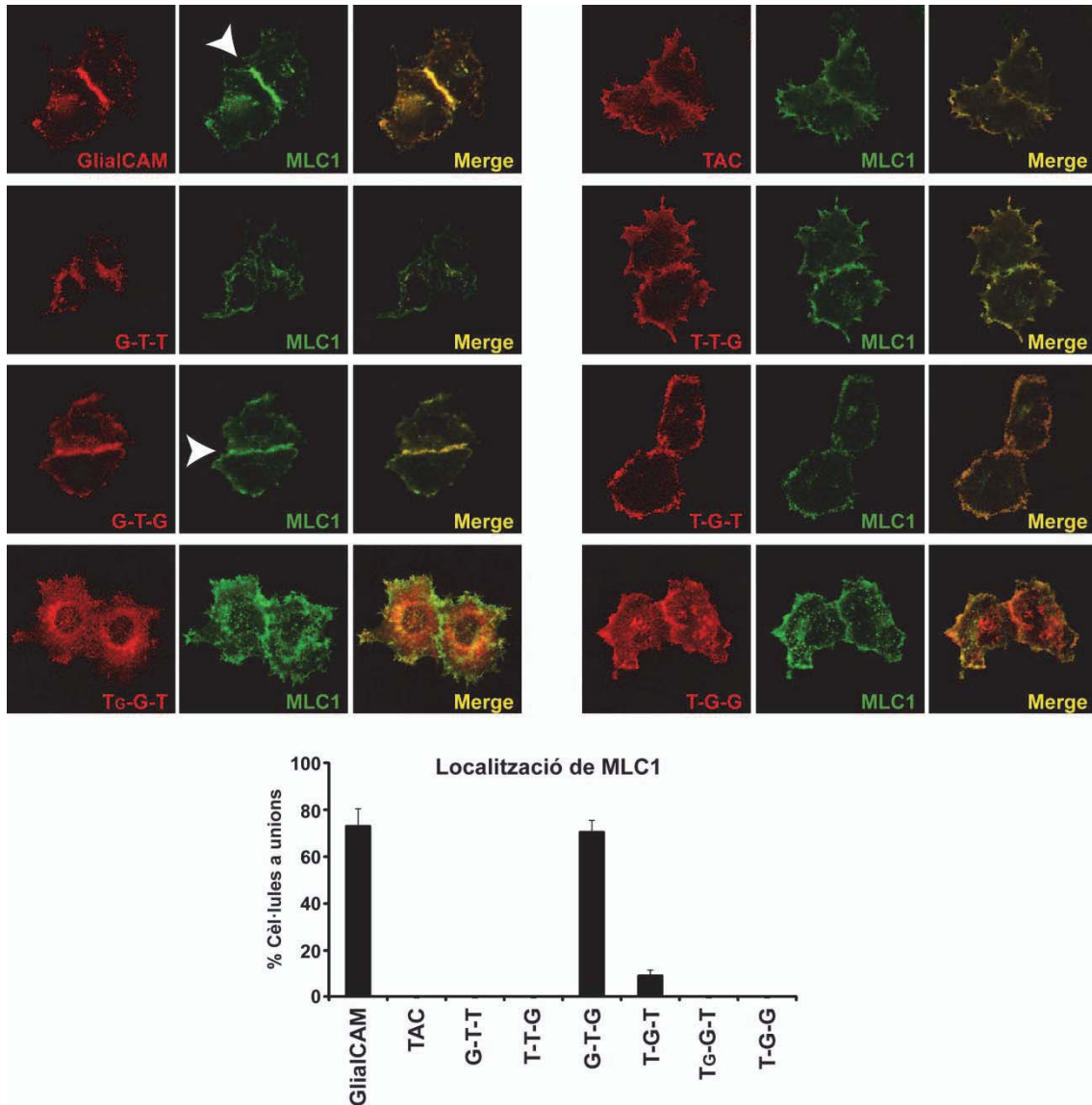


Figura 94. Colocalització de MLC1 i les quimeres GlialCAM-TAC. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb MLC1 i cadascuna de les quimeres GlialCAM-TAC fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada quimera (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de MLC1 (en verd) amb un anticòs policlonal contra MLC1. Es mostra la localització de MLC1 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 4-8 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+MLC1 (n=161); TAC+MLC1 (n=135); G-T-T+MLC1 (n=177); T-T-G+MLC1 (n=180); G-T-G+MLC1 (n=230); T-G-T+MLC1 (n=204); Tc-G-T+MLC1 (n=122); T-G-G+MLC1 (n=296).

Els estudis realitzats per observar la localització de CIC-2 van mostrar els mateixos resultats, ja que l'única quimera capaç de canviar la localització del canal era la quimera G-T-G (Figura 95).

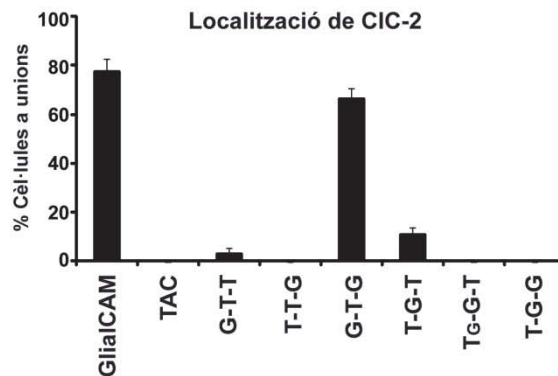
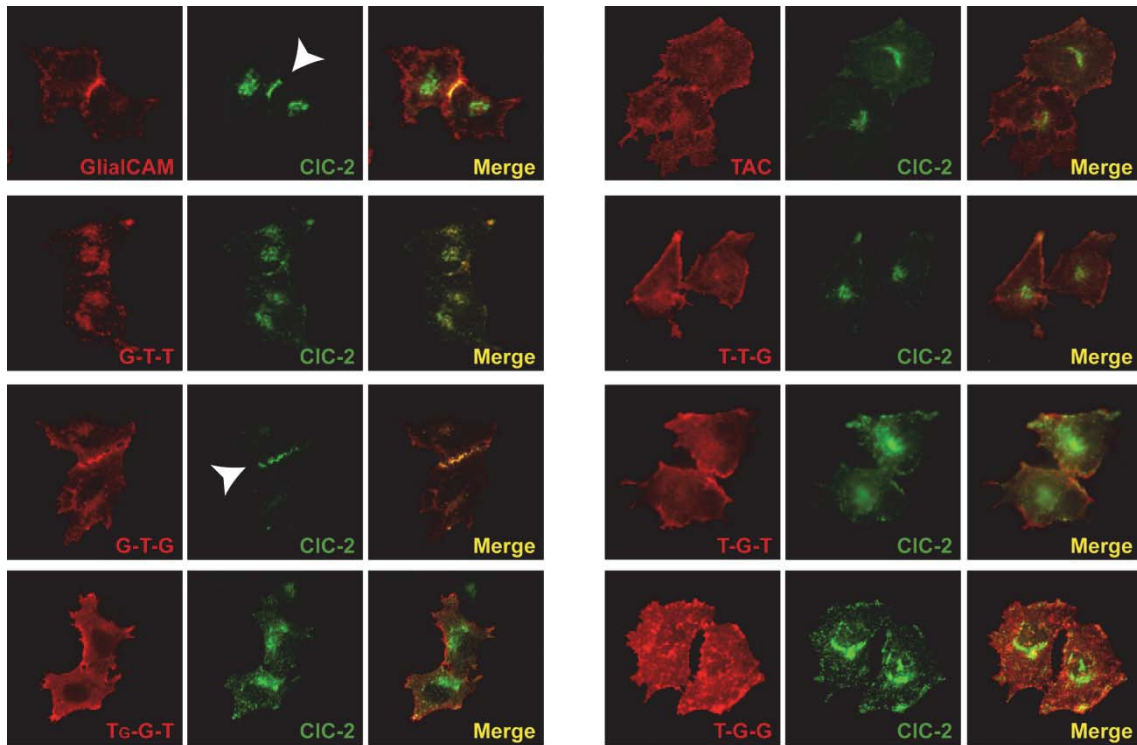


Figura 95. Colocalització de CIC-2 i les quimeres GlialCAM-TAC. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb CIC-2 i cadascuna de les quimeres GlialCAM-TAC fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada quimera (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de CIC-2 (en verd) amb un anticòs policlonal contra CIC-2. Es mostra la localització de CIC-2 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *Intensity profile*. Dades corresponents a 4-10 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+CIC-2 (n=167); TAC+CIC-2 (n=178); G-T-T+CIC-2 (n=153); T-T-G+CIC-2 (n=124); G-T-G+CIC-2 (n=152); T-G-T+CIC-2 (n=138); Tg-G-T+CIC-2 (n=159); T-G-G+CIC-2 (n=202).

La quimera G-T-G era l'única que presentava el domini extracel·lular implicat en la interacció amb MLC1 i CIC-2 i a la vegada, la capacitat de localitzar-se intrínsecament a les unions cel·lulars. Les altres quimeres estudiades no es localitzaven a les unions cel·lulars i per tant, no aconseguen el tràfic de MLC1 ni CIC-2 a aquestes unions encara que interaccionessin bioquímicament.

3.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-TAC.

En col·laboració amb el grup del Dr. Michael Pusch del Institut de Biofísica de Gènova, es van realitzar els mateixos estudis funcionals dels canvis en l'activitat de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-TAC.

Els estudis de *voltage clamp* de la cinètica de desactivació del canal CIC-2 a +60 mV, van mostrar que les quimeres que presentaven el domini transmembrana de GlialCAM tenien una tendència més alta a canviar l'activitat del canal tal i com ho feia GlialCAM (Figura 96). Aquests resultats eren recolzats pel fet que la quimera G-T-G que havia interaccionat bioquímicament amb CIC-2 i havia localitzat el canal a les unions cel·lulars, no provocava cap canvi en l'activitat del canal ja que no tenia el domini transmembrana de GlialCAM.

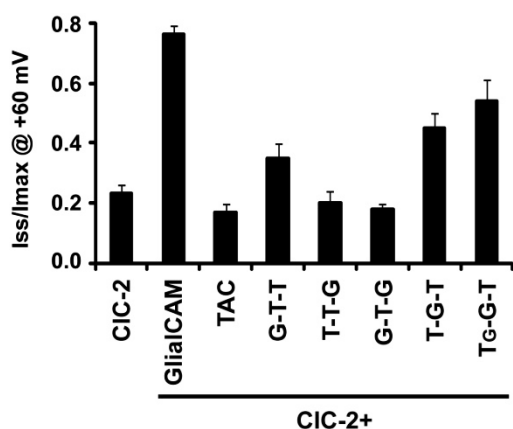


Figura 96. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les quimeres GlialCAM-TAC. Estudis de *voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* que expressen CIC-2 sol, CIC-2+GlialCAM o CIC-2+cadauna de les quimeres GlialCAM-TAC. Es representa la cinètica de desactivació del canal a +60 mV calculada amb la relació entre la corrent obtinguda a *steady state* i la corrent màxima. Dades corresponents a 5-12 experiments independents. La quimera T-G-G es troba en estudi.

Aquests resultats es van reproduir realitzant *patch clamp* en cèl·lules HEK transfectades amb els mateixos grups experimentals (dades no mostrades).

3.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-TAC.

Els estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-TAC impliquen clarament el domini extracel·lular de GlialCAM amb l'homodimerització de la proteïna i amb la interacció amb MLC1 i CIC-2. Per altra banda, també s'observen evidències que el domini transmembrana està implicat en els canvis funcionals de CIC-2 per part de GlialCAM. Aquests estudis presenten una peculiaritat respecte la localització a les unions cel·lulars de GlialCAM. No s'ha pogut relacionar cap domini per si sol amb la localització a les unions cel·lulars però s'ha observat que el domini extracel·lular juntament amb el domini citoplasmàtic localitzen la proteïna a les unions cel·lulars. El tràfic tant de MLC1 com de CIC-2 a les unions cel·lulars depèn de la capacitat d'interaccionar bioquímicament i de la capacitat intrínseca de la quimera a localitzar-se

als contactes entre cèl·lules. Aquest fet fa que es requereixi la quimera que conté conjuntament els dominis extracel·lular i citoplasmàtic per localitzar les proteïnes a les unions cel·lulars.

Tenint en compte els resultats de localització obtinguts amb les quimeres i les deleccions de GlialCAM, es podria dir que el domini citoplasmàtic de GlialCAM és necessari per la localització de la proteïna a les unions cel·lulars, però no és suficient ja que qualsevol defecte en el domini extracel·lular o el canvi pel domini extracel·lular de TAC impedeix aquest localització.

Domini	Deleccions GlialCAM	Quimeres GlialCAM-TAC
Extracel·lular	Afecta interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització G / M / C Funció ?	Permet interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització G / M / C No afecta funció
Transmembrana	?	No afecta interacció No afecta localització Permet funció
Citoplasmàtic	No afecta interacció Afecta localització G / M / C (menor) No afecta funció	No afecta interacció Afecta localització G / M / C No afecta funció

Figura 97. Resum dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. Taula on s'ha diferenciat els dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM i on es mostra els processos en els quals estan implicats aquests dominis segons els estudis realitzats amb les deleccions de GlialCAM i amb les quimeres GlialCAM-TAC. G:GlialCAM, M:MLC1, C:CIC-2.

4. ESTUDIS DE LES PROTEÏNES QUIMÈRIQUES GLIALCAM-HEPACAM2.

Les diferències observades entre els resultats obtinguts amb les deleccions i amb les quimeres GlialCAM-TAC es podien deure a les diferències estructurals i funcionals que tenen GlialCAM i TAC. Per això, es van construir quimeres amb HepaCAM2 que és una proteïna de la mateixa família que GlialCAM. La finalitat d'aquestes noves quimeres era intentar definir millor la funció de cada domini utilitzant aquesta proteïna pròxima a GlialCAM que comparteix els mateixos tipus de dominis i característiques de molècula d'adhesió.

HepaCAM2 presenta una estructura de proteïna de membrana tipus I amb l'extrem N-terminal extracel·lular i l'extrem C-terminal citoplasmàtic i un sol pas transmembrana. La proteïna consta de 462 aminoàcids i presenta diferents dominis estructurals. A l'extrem N-terminal té un pèptid senyal i a la resta de regió extracel·lular presenta 3 dominis *Ig-like* dels quals hi ha evidències que un és un domini IgV. El seu pas transmembrana consta de 20 aminoàcids i la cua citoplasmàtica de 90 aminoàcids.

Tant l'estructura, com la localització, com la funció d'aquesta proteïna, estan molt poc estudiades però s'ha descrit que presenta baixos nivells de transcripció en carcinomes mamaris i que és un dels gens candidats a causar retard mental i microcefàlia en la distonia mioclònica (Klopfleisch et al., 2010; Saugier-Veber et al., 2010).

Per a la generació de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 es va decidir separar el domini extracel·lular, el domini transmembrana i el domini citoplasmàtic de les dues proteïnes i construir proteïnes quimèriques amb totes les combinacions possibles (**Figura 98**). Per la identificació de les quimeres es va utilitzar la mateixa nomenclatura que anteriorment, anomenant **H** als dominis corresponents a la proteïna HepaCAM2.

Les sis quimeres GlialCAM-HepaCAM2 construïdes van ser les següents:

1. **H-H-G**: Formada pels dominis extracel·lular i transmembrana d'HepaCAM2 i el citoplasmàtic de GlialCAM.
2. **H-G-H**: Formada pels dominis extracel·lular i citoplasmàtic d'HepaCAM2 i el transmembrana de GlialCAM.
3. **G-H-H**: Formada pels dominis transmembrana i citoplasmàtic d'HepaCAM2 i l'extracel·lular de GlialCAM.
4. **H-G-G**: Formada pels dominis transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM i l'extracel·lular d'HepaCAM2.
5. **G-H-G**: Formada pels dominis extracel·lular i citoplasmàtic de GlialCAM i el transmembrana d'HepaCAM2.
6. **G-G-H**: Formada pels dominis extracel·lular i transmembrana de GlialCAM i el citoplasmàtic d'HepaCAM2.

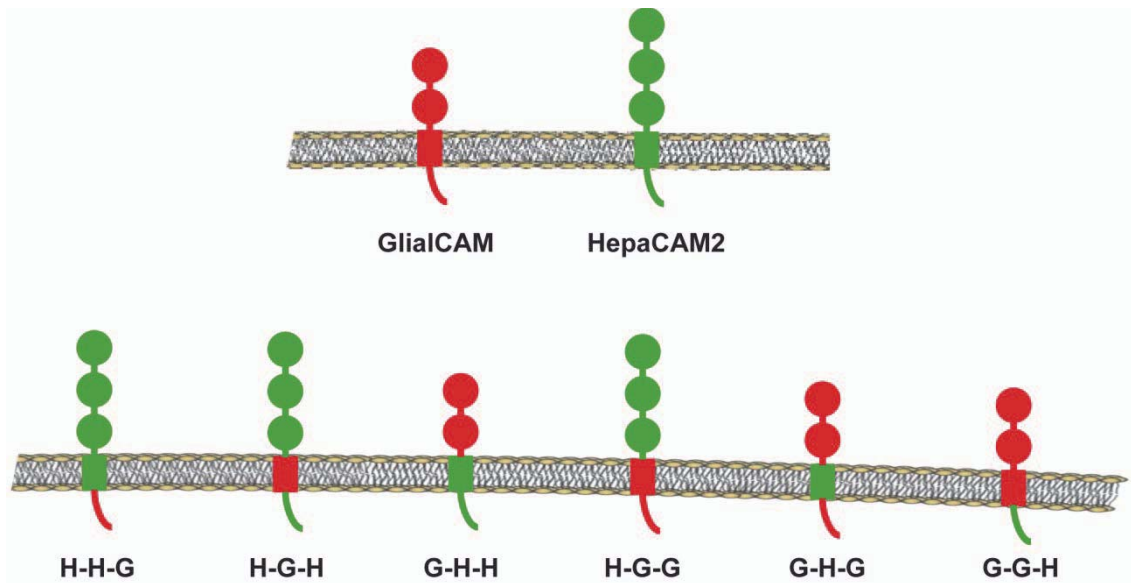


Figura 98. Representació esquemàtica de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Esquema representatiu de GlialCAM, HepaCAM2 i les quimeres construïdes a partir de la combinació dels dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de les dues proteïnes. Es mostra la nomenclatura utilitzada per identificar cada quimera.

4.1. Caracterització de l'expressió i localització de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

Es van transfectar cèl·lules HeLa i es van estudiar els nivells d'expressió per WB utilitzant un anticòs contra l'epítip Flag (Figura 99).

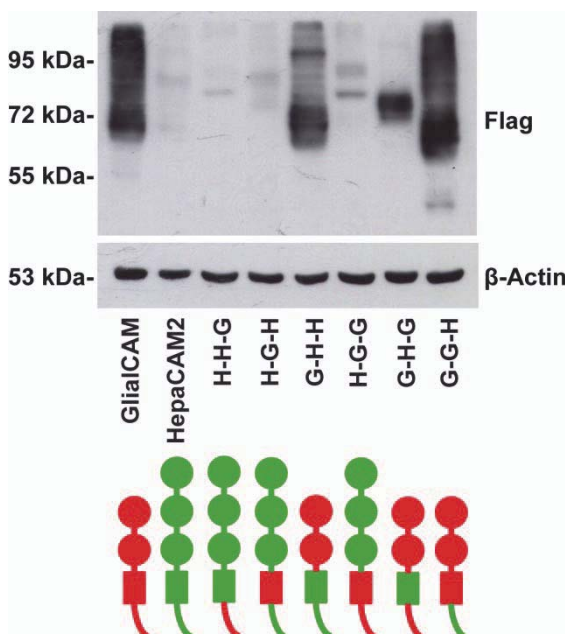


Figura 99. Caracterització dels nivells d'expressió de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Cèl·lules HeLa transfectades amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 fusionades a l'epítip Flag, analitzades per WB. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag i la detecció de β -Actin com a control de càrrega. Es mostra l'esquema representatiu de cada quimera.

Es va observar que existien grans diferències entre els nivells d'expressió de GlialCAM i HepaCAM2 ja que HepaCAM2 tenia uns nivells d'expressió molt baixos. Aquesta diferència també es va observar entre les quimeres construïdes a partir d'aquestes

dues proteïnes. Les quimeres que presentaven el domini extracel·lular de GlialCAM s'expressaven amb uns nivells semblants a GlialCAM i les que presentaven el domini extracel·lular d'HepaCAM2 presentaven baixos nivells d'expressió, semblants a HepaCAM2.

En quan la localització, també es va observar una gran diferència entre la localització a la membrana plasmàtica i a les unions cel·lulars de GlialCAM i la localització completament citoplasmàtica d'HepaCAM2 (**Figura 100**).

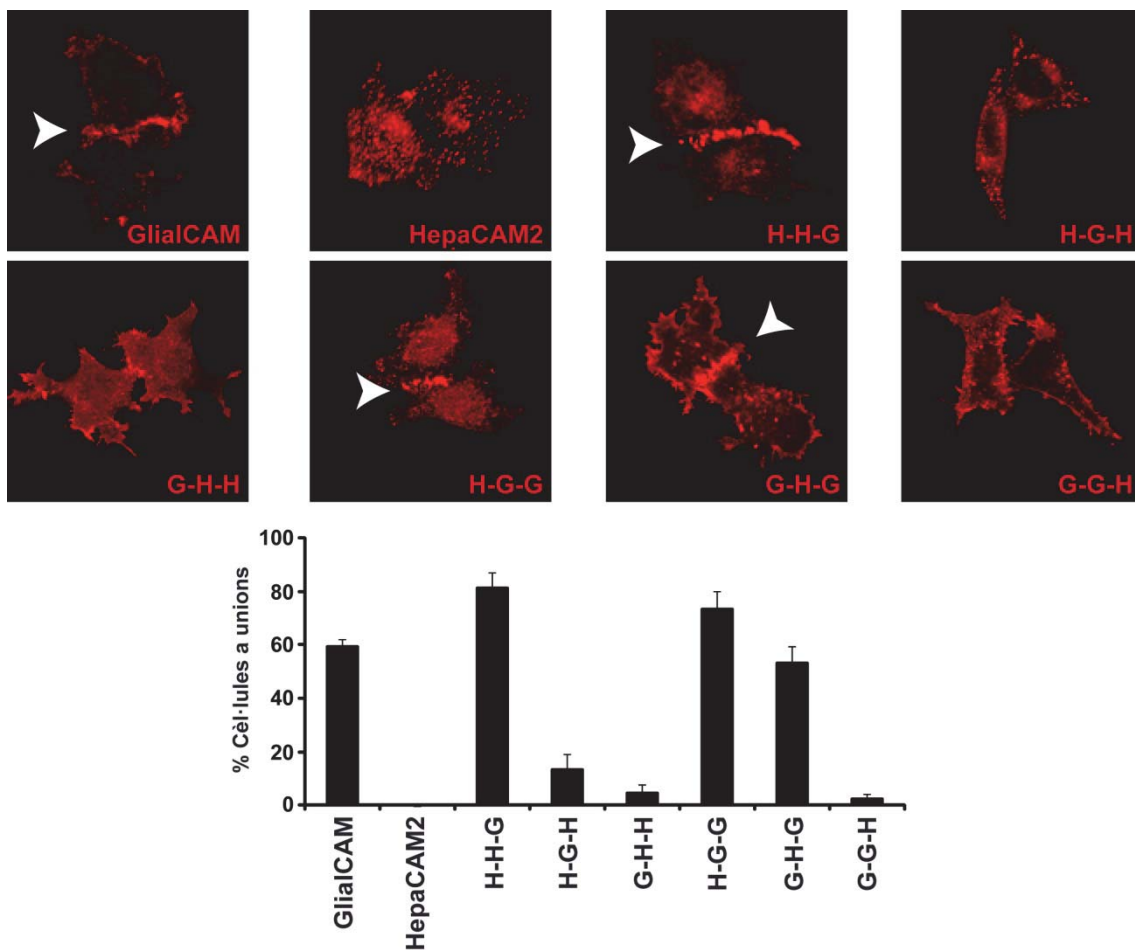


Figura 100. Localització de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 en cèl·lules HeLa. Cèl·lules HeLa transfectades amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag. Es mostra la localització concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 8-13 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM (n=449); HepaCAM2 (n=232); H-H-G (n=396); H-G-H (n=326); G-H-H (n=569); H-G-G (n=381); G-H-G (n=574); G-G-H (n=459).

Les quimeres que tenien el domini extracel·lular de GlialCAM tendien a localitzar-se a la membrana plasmàtica mentre que les que tenien el domini extracel·lular d'HepaCAM2 tendien a mostrar una localització més retinguda al citosol. Tot i així,

totes les quimeres que tenien el domini citoplasmàtic de GlialCAM eren capaces de concentrar-se majoritàriament a les unions cel·lulars (**Figura 100, fletxes i gràfica**). Aquesta concentració a les unions cel·lulars era provocada pel domini citoplasmàtic i independent del domini extracel·lular, ja que es localitzaven a unions la quimera G-H-G (tendència a localitzar-se a membrana) i les quimeres H-H-G i H-G-G (tendència a localitzar-se al citosol).

4.2. Caracterització de la interacció de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

Es van validar les interaccions GlialCAM-GlialCAM, GlialCAM-MLC1 i GlialCAM-CIC-2 pel mètode Split-TEV, realitzant assajos de luminescència amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 (**Figura 101**).

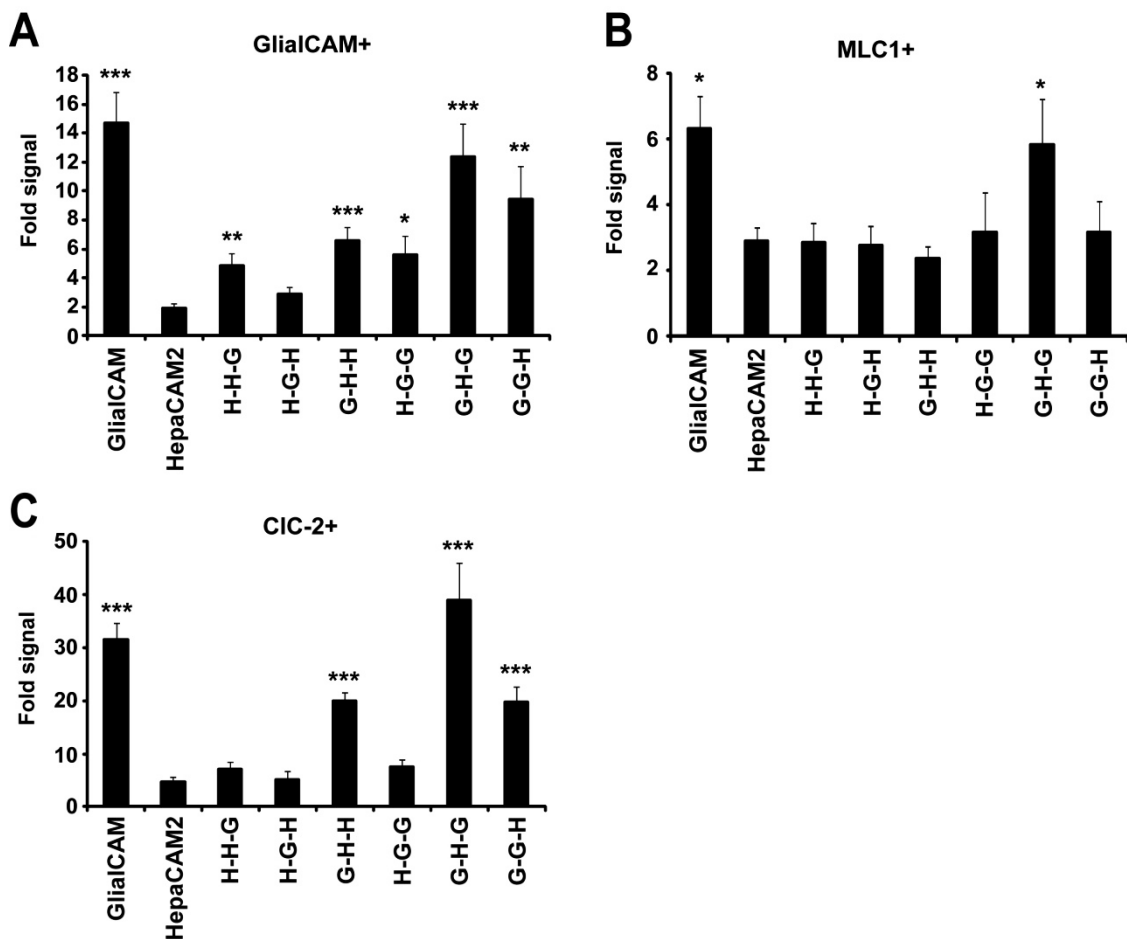


Figura 101. Estudis d'interacció de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre GlialCAM i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Dades corresponents a 11-18 experiments independents. **B.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre MLC1 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Dades corresponents a 12-19 experiments independents. **C.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV en validar la interacció entre CIC-2 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Dades corresponents a 6-12 experiments independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecte la senyal obtinguda amb HepaCAM2; t-student no aparellada.

En l'estudi de l'homodimerització de GlialCAM (**Figura 101 A**), es va observar que les quimeres que tenien el domini extracel·lular de GlialCAM presentaven uns nivells d'inducció d'interacció més alts i amb major significació estadística respecte la senyal d'HepaCAM2. Per altra banda, les quimeres H-H-G i H-G-G també mostraven diferències significatives respecte HepaCAM2. Aquestes diferències podien significar que el domini citoplasmàtic de GlialCAM també estava implicat en el procés d'homodimerització o es podia tractar de falsos positius degut a que eren dues quimeres amb una expressió molt reduïda.

La validació de la interacció GlialCAM-MLC1 (**Figura 101 B**), va mostrar que únicament la quimera G-H-G interaccionava significativament amb MLC1.

Els assajos de Split-TEV per validar la interacció entre MLC1 i GlialCAM generaven problemes a l'hora de ser interpretats degut a la baixa inducció de senyal que s'obtenia en la interacció MLC1-GlialCAM (control positiu). La interacció validada entre MLC1 i GlialCAM generava una inducció al voltant de 6 *fold* mentre que la interacció MLC1-HepaCAM2 (control negatiu o soroll de fons del mètode) generava una inducció al voltant de 2 *fold*. Aquesta poca diferència entre la màxima inducció esperada i el soroll de fons del mètode, dificultava la interpretació dels canvis observats en els nivells d'interacció de les quimeres. A més a més, aquests problemes augmentaven en treballar amb quimeres que presentaven diferents nivells d'expressió com són les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. En els estudis de les quimeres GlialCAM-TAC, la correcta expressió de totes les quimeres minimitzava el problema d'interpretació dels resultats deguts a la baixa inducció de senyal que oferia aquesta conformació del mètode.

Finalment, l'estudi de l'heterodimerització GlialCAM-CIC-2 (**Figura 101 C**) va mostrar que el domini implicat en la interacció entre GlialCAM i CIC-2 era el domini extracel·lular, ja que únicament mostraven interacció estadísticament significativa aquelles quimeres que contenien aquest domini.

4.3. Caracterització del tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

Es van realitzar assajos d'immunofluorescència en cèl·lules HeLa cotransfectades amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 i MLC1 o CIC-2.

En analitzar el percentatge de cèl·lules que mostraven una localització de MLC1 a les unions cel·lulars mitjançant l'anàlisi de l'*intensity profile* (**Figura 102**), es va observar que l'única quimera que localitzava MLC1 a les unions cel·lulars era la quimera G-H-G.

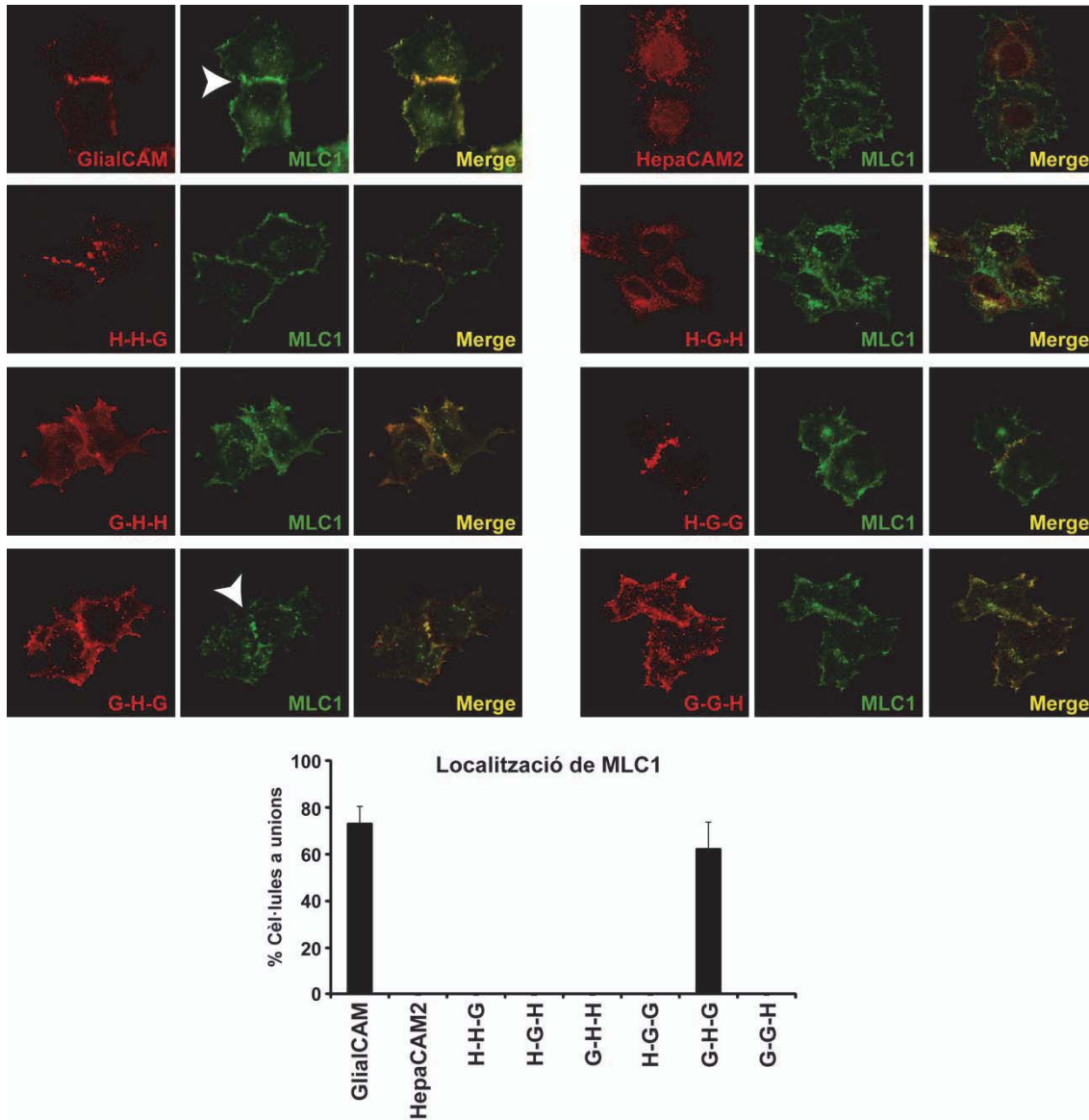


Figura 102. Colocalització de MLC1 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb MLC1 i cadascuna de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada quimera (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de MLC1 (en verd) amb un anticòs policlonal contra MLC1. Es mostra la localització de MLC1 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 4-8 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+MLC1 (n=161); HepaCAM2+MLC1 (n=114); H-H-G+MLC1 (n=108); H-G-H+MLC1 (n=105); G-H-H+MLC1 (n=150); H-G-G+MLC1 (n=98); G-H-G+MLC1 (n=119); G-G-H+MLC1 (n=159).

Es van observar els mateixos resultats amb la capacitat de localitzar CIC-2 a les unions cel·lulars ja que únicament ho aconseguia la quimera G-H-G (**Figura 103**).

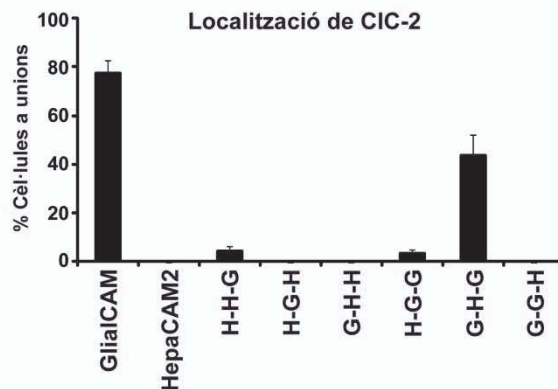
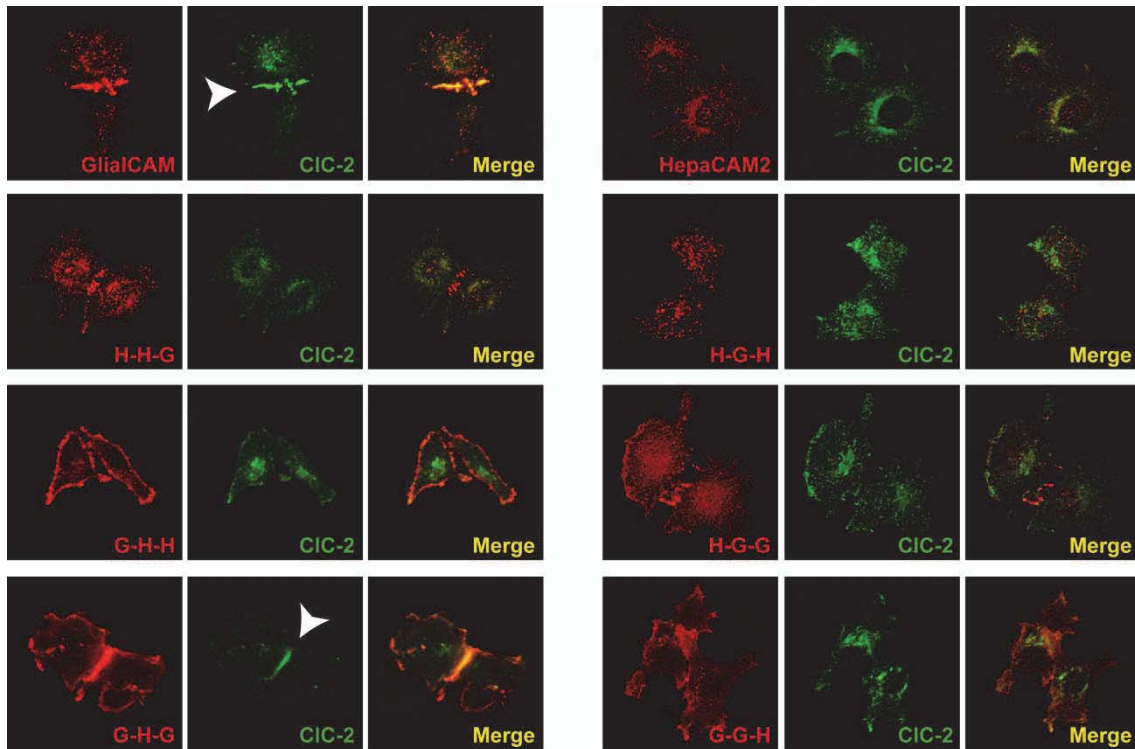


Figura 103. Colocalització de CIC-2 i les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb CIC-2 i cadascuna de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. Es detecta la localització de cada quimera (en vermell) amb un anticòs monoclonal contra Flag i la localització de CIC-2 (en verd) amb un anticòs policlonal contra CIC-2. Es mostra la localització de CIC-2 concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 7-11 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: GlialCAM+CIC-2 (n=167); HepaCAM2+CIC-2 (n=179); H-H-G+CIC-2 (n=314); H-G-H+CIC-2 (n=190); G-H-H+CIC-2 (n=219); H-G-G+CIC-2 (n=276); G-H-G+CIC-2 (n=277); G-G-H+CIC-2 (n=172).

La quimera G-H-G era l'única quimera de totes les estudiades que presentava dues característiques claus: tenia el domini citoplasmàtic de GlialCAM que li proporcionava la capacitat de localitzar-se intrínsecament a les unions cel·lulars, i a la vegada, el domini extracel·lular que li proporcionava la capacitat d'interaccionar amb MLC1 i CIC-2. Les altres quimeres que es localitzaven a les unions (H-H-G i H-G-G) no interaccionaven amb MLC1 i CIC-2 i les que si que ho feien (G-H-H i G-G-H) no es localitzaven als contactes cel·lulars.

4.4. Estudis dels canvis funcionals de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

En col·laboració amb el grup del Dr. Michael Pusch del Institut de Biofísica de Gènova, es van realitzar els mateixos estudis funcionals dels canvis en l'activitat de CIC-2 amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

Igual que havia succeït amb les quimeres GlialCAM-TAC, els estudis de *voltage clamp* de la cinètica de desactivació del canal CIC-2 a +60 mV, van mostrar que les quimeres que presentaven el domini transmembrana de GlialCAM tenien una tendència més alta a canviar l'activitat del canal tal i com ho feia GlialCAM (**Figura 104**). En aquest cas la quimera G-H-G que presentava les característiques d'interacció i tràfic de CIC-2 tampoc provocava canvis en l'activitat del canal.

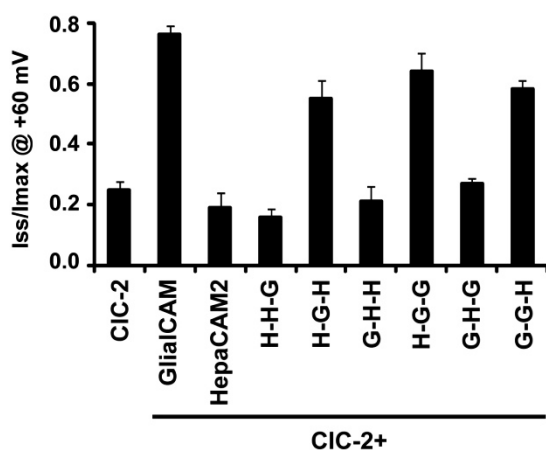


Figura 104. Estudi electrofisiològic dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats per les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Estudis de *voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* que expressen CIC-2 sol, CIC-2+GlialCAM o CIC-2+cadauna de les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. Es representa la cinètica de desactivació del canal a +60 mV calculada amb la relació entre la corrent obtinguda a *steady state* i la corrent màxima. Dades corresponents a 5-12 experiments independents.

Aquests resultats es van reproduir realitzant *patch clamp* en cèl·lules HEK transfectades amb els mateixos grups experimentals (dades no mostrades).

4.5. Conclusions dels estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2.

Els estudis realitzats amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 impliquen el domini extracel·lular de GlialCAM amb els nivells d'expressió de la proteïna. A més a més, aquest domini també és responsable de l'homodimerització de la proteïna i de la interacció de GlialCAM amb MLC1 i CIC-2.

El domini citoplasmàtic és el domini implicat en la localització de GlialCAM als contactes entre cèl·lules. Per poder localitzar MLC1 i CIC-2 a aquests contactes, es necessita l'acció conjunta del domini citoplasmàtic que proporciona la capacitat de localització a les unions i del domini extracel·lular que proporciona la capacitat de interaccionar amb MLC1 i CIC-2.

Finalment, aquests estudis reafirmen les evidències que el domini transmembrana és el domini implicat en els canvis funcionals de CIC-2 per part de GlialCAM.

Domini	Delecions GlialCAM	Quimeres GlialCAM-TAC	Quimeres GlialCAM-HepaCAM2
Extracel·lular	Afecta interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització G / M / C Funció ?	Permet interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització G / M / C No afecta funció	Permet interacció G-G / G-M / G-C Afecta localització M / C No afecta funció
Transmembrana	?	No afecta interacció No afecta localització Permet funció	No afecta interacció No afecta localització Permet funció
Citoplasmàtic	No afecta interacció Afecta localització G / M / C (menor) No afecta funció	No afecta interacció Afecta localització G / M / C No afecta funció	No afecta interacció Permet localització G / M / C No afecta funció

Figura 105. Resum dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. Taula on s'ha diferenciat els dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic de GlialCAM i on es mostra els processos en els quals estan implicats aquests dominis segons els estudis realitzats amb les delecions de GlialCAM, amb les quimeres GlialCAM-TAC i amb les quimeres GlialCAM-HepaCAM2. G:GlialCAM, M:MLC1, C:CIC-2.

5. ESTUDIS PER IDENTIFICAR ELS DOMINIS DE GLIALCAM IMPLICATS EN LA LOCALITZACIÓ A LES UNIONS CEL·LULARS.

Els resultats de localització obtinguts fins al moment mostraven diferències amb totes les quimeres i delecions estudiades. L'estudi de les delecions implicava els dominis extracel·lular i el citoplasmàtic per si sols. En canvi, l'estudi de les quimeres amb HepaCAM2 mostrava que únicament es requeria el domini citoplasmàtic. Finalment, les quimeres construïdes amb TAC només es localitzaven a les unions cel·lulars en presentar conjuntament els dominis extracel·lular i citoplasmàtic.

Totes aquestes diferències amb els resultats obtinguts, van generar la hipòtesi que era necessari un estat d'oligomerització per localitzar la proteïna a les unions cel·lulars. Una de les diferències entre els dominis extracel·lulars *Sushi* de TAC i els dominis *Ig-like* d'HepaCAM2 és la capacitat d'oligomeritzar. Aquesta diferència no es veu entre GlialCAM i HepaCAM2 ja que presenten el mateix tipus de dominis extracel·lulars. Per tant, totes les quimeres GlialCAM-HepaCAM2 tenen la capacitat d'oligomeritzar i el sol fet de presentar el domini citoplasmàtic de GlialCAM ja localitza les proteïnes a les unions cel·lulars. En canvi, no totes les quimeres GlialCAM-TAC tenen aquesta capacitat d'oligomerització, i per això presentar el domini citoplasmàtic de GlialCAM no és suficient per localitzar les proteïnes a les unions cel·lulars. Únicament la quimera que conté el domini citoplasmàtic i l'extracel·lular de GlialCAM a la vegada, és la que es concentra als contactes entre cèl·lules ja que és l'única que compleix els dos requisits.

Per verificar aquesta hipòtesi es va utilitzar la proteïna del sistema immunitari CD4 i una variant d'aquesta proteïna a la que se li ha afegit una seqüència *coiled-coil* (CD4cc) que proporciona la capacitat de dimeritzar. Es van construir noves quimeres fusionant a l'extrem C-terminal de les variants de CD4 el domini citoplasmàtic de GlialCAM i es van portar a terme estudis d'interacció i de localització (**Figura 106**).

Per comprovar la capacitat de dimeritzar es van clonar totes les construccions als vectors adequats per realitzar el mètode Split-TEV i es van realitzar els assajos de luminescència (**Figura 106 A**). Es va observar que CD4 no interaccionava ni amb ell mateix, ni amb la variant CD4cc. En canvi, CD4cc interaccionava fortament amb ell mateix i no amb CD4 degut a les seqüències *coiled-coil*. També es va observar que la fusió del domini citoplasmàtic de GlialCAM no provocava cap canvi en la capacitat de dimeritzar d'aquestes proteïnes.

Un cop corroborada la capacitat de dimerització de les proteïnes utilitzades, es van fer estudis de localització a les unions cel·lulars en cèl·lules HeLa (**Figura 106 B**). CD4 i CD4cc mostraven una localització a la membrana cel·lular. Per altra banda, la fusió del domini citoplasmàtic de GlialCAM a CD4 no provocava canvis en la localització d'aquesta proteïna però la fusió d'aquest mateix domini a CD4cc, provocava que en alguns casos la proteïna es localitzés concentrada a les unions cel·lulars (**Figura 106 B, fletxa i gràfica**). En aquest cas es va observar al voltant d'un 10% de cèl·lules que presentaven aquesta localització. Aquest baix percentatge podria ser degut a que el sistema utilitzat és un sistema on es força les proteïnes a adquirir unes característiques funcionals determinades, molt diferents a les característiques intrínseques de les proteïnes utilitzades.

Amb aquests estudis es va concloure la identificació dels dominis implicats en la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars. El domini citoplasmàtic és necessari per localitzar la proteïna als contactes entre cèl·lules, però es necessita un estat d'oligomerització proporcionat pel domini extracel·lular, per generar les condicions adequades per adquirir aquesta localització concreta.

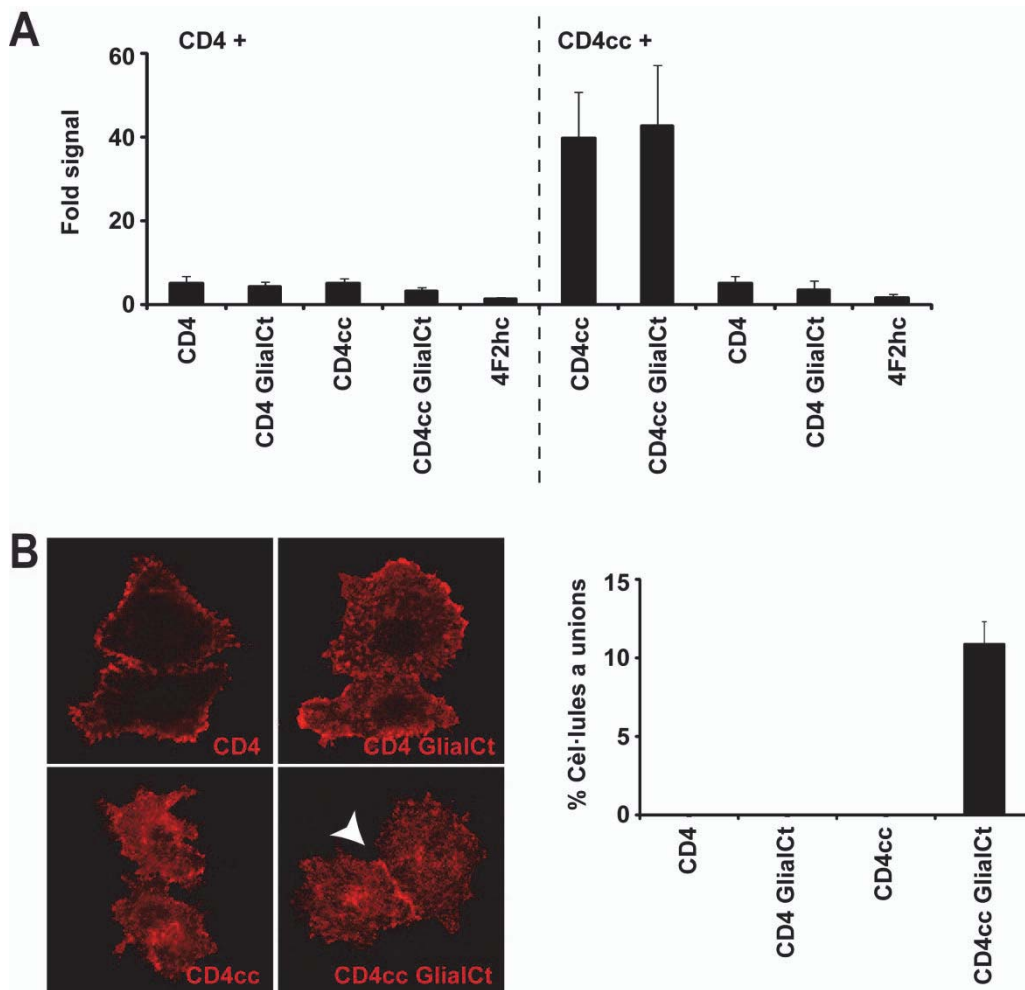


Figura 106. Estudis bioquímics amb CD4 i CD4cc. **A.** Inducció de senyal obtinguda per Split-TEV per validar la no dimerització de CD4 i la dimerització de CD4cc utilitzant les construccions descrites. S'utilitza la proteïna no relacionada 4F2hc com a control negatiu d'interacció. Dades corresponents a 4 experiments independents. **B.** Cèl·lules HeLa transfectades amb les construccions descrites fusionades a l'epítip Flag, analitzades per immunofluorescència. S'utilitza un anticòs monoclonal contra Flag. Es mostra la localització concentrada en unions cel·lulars (fletxes) i el comptatge del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta localització en cada grup experimental mitjançant *intensity profile*. Dades corresponents a 4-5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: CD4 (n=349); CD4 GlialCt (n=265); CD4cc (n=354); CD4cc GlialCt (n=428).

Per últim, es va voler observar si GlialCAM interaccionava directament amb la proteïna d'ancoratge al citoesquelet d'actina ZO-1, ja que s'ha descrit que la localització de GlialCAM depèn del citoesquelet d'actina (Moh et al., 2009). Es van realitzar assajos d'interacció mitjançant Co-IP i Split-TEV i no es va poder validar la interacció de GlialCAM amb ZO-1 per cap dels mètodes utilitzats (dades no mostrades).

6. ESTUDIS PER IDENTIFICAR ELS AMINOÀCIDS INVOLUCRATS EN ELS CANVIS FUNCIONALS DE CIC-2 PER PART DE GLIALCAM.

Ja que s'havia relacionat clarament el domini transmembrana de GlialCAM amb l'activació del canal CIC-2, es va voler estudiar quins aminoàcids concrets estaven implicats en aquests canvis funcionals mitjançant estudis d'*Alanin scanning*.

Per portar a terme aquests estudis, es va dividir el domini transmembrana de GlialCAM (24 aminoàcids) en grups de 3 i es van mutar cadascun dels aminoàcids per Alanina que és un aminoàcid no polar.

Aquesta mutació dirigida es va fer mitjançant PCR recombinant. Posteriorment, es va fusionar a cada constructe l'epítip Flag i es van clonar als vectors destí pCS i pcDNA3 mitjançant la tecnologia *Gateway* (Invitrogen) per realitzar estudis de *patch clamp* i *voltage clamp*.

La nomenclatura que es va utilitzar per identificar aquestes mutacions del domini transmembrana va ser anomenar els aminoàcids que havien estat mutats pel lloc que ocupaven en el domini transmembrana des del punt més N-terminal al punt més C-terminal (**Figura 107 A**).

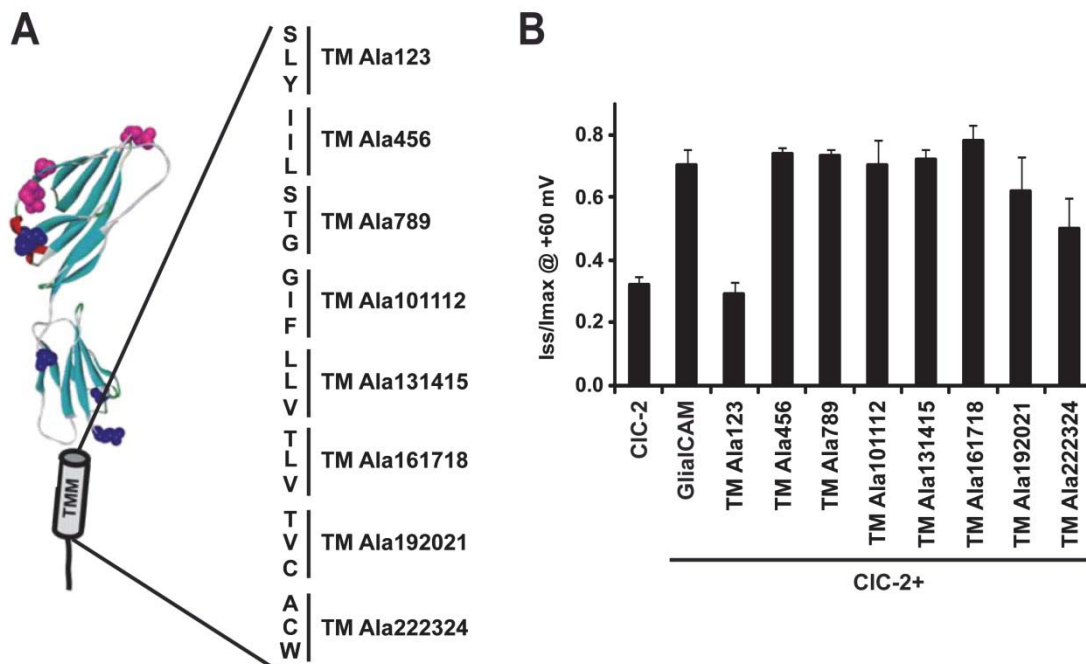


Figura 107. Estudis electrofisiològics dels canvis en l'activitat de CIC-2 provocats pel domini transmembrana de GlialCAM mitjançant la mutació dels seus aminoàcids a Alanina. **A.** Representació esquemàtica dels aminoàcids que formen el domini transmembrana de GlialCAM. Es mostra els grups de tres aminoàcids els quals s'han mutat a Alanina i la nomenclatura utilitzada per identificar-los. **B.** Estudis de *voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* que expressen CIC-2 sol, CIC-2+GlialCAM o CIC-2+cadascuna de les mutacions del domini transmembrana de GlialCAM. Es representa la cinètica de desactivació del canal a +60 mV calculada amb la relació entre la corrent obtinguda a *steady state* i la corrent màxima. Dades corresponents a 5-12 experiments independents.

Es van realitzar els assajos funcionals de cinètica de desactivació del canal a +60mV en col·laboració amb el laboratori del Dr. Michael Pusch (**Figura 107 B**).

Es va observar que l'única construcció que no produïa canvis en l'activitat de CIC-2 era la mutació TM Ala123, tota la resta de mutacions no afectaven el canvi en l'activitat del canal i per tant es comportaven com GlialCAM *wild type*.

Els estudis de *patch clamp* realitzats en cèl·lules HEK transfectades amb els mateixos grups experimentals, van reproduir els resultats obtinguts (dades no mostrades).

En conclusió, s'ha identificat el domini transmembrana de GlialCAM com a domini implicat en els canvis funcionals produïts al canal de clorur CIC-2. Més concretament, s'ha mapat que els aminoàcids responsables d'aquests canvis funcionals són la Serina241, la Leucina242 i la Tirosina243 situades just al principi del domini transmembrana.

7. ESTUDIS DE LA INTERACCIÓ EN TRANS DE GLIALCAM.

Proteïnes amb l'estructura semblant a GlialCAM, com són els membres de la família de les JAM, interaccionen en *trans* amb proteïnes d'altres cèl·lules. S'ha descrit que les interaccions *trans* d'aquestes molècules s'efectuen amb el domini IgV quan es tracta d'interaccions homofíliques i s'efectuen amb el domini IgC2 quan es tracta d'interaccions heterofíliques (Ebnet et al., 2003, 2004; Mandell et al., 2004). Tots els estudis d'interacció de GlialCAM han mostrat interacció en *cis*, tant de manera homofílica com de manera heterofílica, però no s'ha descrit la interacció en *trans* d'aquesta proteïna (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005). Estudis preliminars del grup mostren que la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars únicament s'observa quan hi ha dues cèl·lules transfectades en contacte. En canvi, aquesta concentració de la proteïna a les unions no s'observa en els casos de la unió de dues cèl·lules on només n'hi ha una de transfectada. Això indica que pot existir la interacció *trans* de la proteïna i que pot tenir relació amb la localització.

En aquest apartat es pretén avançar en la caracterització de GlialCAM i més concretament en la descripció de la possible interacció en *trans* de la proteïna.

7.1. Realització d'un anticòs quimèric amb el domini extracel·lular de GlialCAM.

Per poder realitzar diferents assajos per estudiar la interacció en *trans* de GlialCAM, es va generar un anticòs quimèric fusionant el domini extracel·lular de GlialCAM a la fracció constant (Fc) de la immunoglobulina G de ratolí o humana.

Per això, es va clonar el domini extracel·lular de GlialCAM al vector d'expressió pINFuse (InvivoGen) mitjançant la metodologia de clonació clàssica. Aquest vector de clonatge expressa els dominis CH2 i CH3 de la cadena pesada de la immunoglobulina G de ratolí o humana, juntament amb una regió acobladora (*hinge region*) que provoca una unió flexible entre les dues parts de la proteïna i permet que puguin funcionar independentment. Les proteïnes recombinants produïdes a partir d'aquest vector actuen com un anticòs generat en ratolí (o en humà) (**Figura 108**).

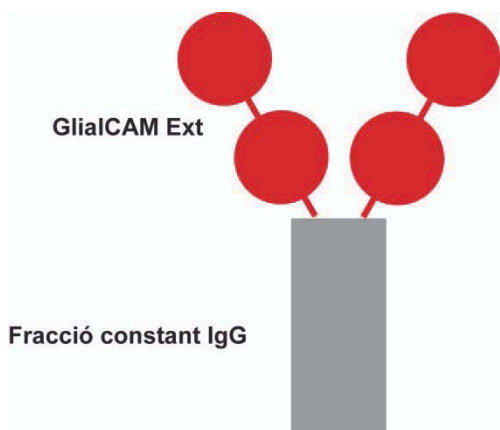


Figura 108. Esquema representatiu de l'anticòs quimèric construït. El clonatge en el vector d'expressió pINFuse (InvivoGen) ha permès generar un anticòs que conté la fracció constant de la immunoglobulina G de ratolí (o humana), però enlloc de la fracció variable conté el domini extracel·lular de GlialCAM.

Un cop generat el constructe que es va anomenar GlialCAM Ext Fc, es van transfectar cèl·lules HEK per produir la proteïna recombinant que era excretada al medi. Posteriorment es va concentrar el medi obtingut i es va purificar la proteïna mitjançant una columna d'afinitat. Es van valorar les fraccions obtingudes i es va detectar la producció per WB (**Figura 109**).

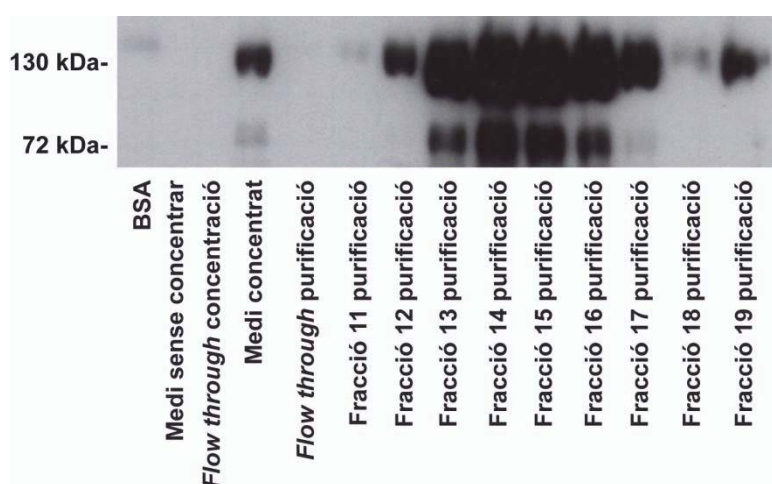


Figura 109. Producció, concentració i purificació de la proteïna GlialCAM Ext Fc. Anàlisi per WB de les diferents fases de producció de la proteïna recombinant GlialCAM Ext Fc. Es mostra la senyal obtinguda en el medi de producció sense concentrar i després de concentrar i en les diferents fraccions obtingudes després de la purificació per afinitat.

Encara que es va aconseguir produir i purificar la proteïna quimèrica, van haver-hi problemes a l'hora d'aconseguir altes concentracions de proteïna. Per això, es va decidir externalitzar la producció a una empresa, ja que era necessària una bona quantitat de proteïna produïda per continuar amb el projecte. Així, es van obtenir mg de proteïna recombinant GlialCAM Ext Fc que contenia la Fc de ratolí.

7.2. Estudi de la interacció en *trans* de GlialCAM mitjançant la metodologia de *Cell Surface Binding Assay*.

Aquesta metodologia es basa en una immunocitoquímica en cèl·lules sense permeabilitzar on s'utilitza com a anticòs primari la proteïna quimèrica que conté el fragment de la proteïna d'estudi fusionat a una Fc. S'ha de tenir en compte que primer ha de tenir lloc la interacció i posteriorment s'ha de realitzar la fixació de les cèl·lules. Aquesta metodologia ha permès identificar interaccions *trans* entre diferents proteïnes de membrana (Boucard et al., 2005; Uemura et al., 2010).

Es va utilitzar aquesta tècnica per provar la interacció *trans* de GlialCAM. Per això, es van cotransfectar cèl·lules HeLa amb GlialCAM i la proteïna Cherry per tenir un control de les cèl·lules transfectades. Es va realitzar la immunocitoquímica utilitzant com anticòs primari la proteïna quimèrica GlialCAM Ext Fc. Com a control positiu del mètode es va utilitzar un anticòs comercial monoclonal contra GlialCAM que reconeix la part extracel·lular de la proteïna (**Figura 110**).

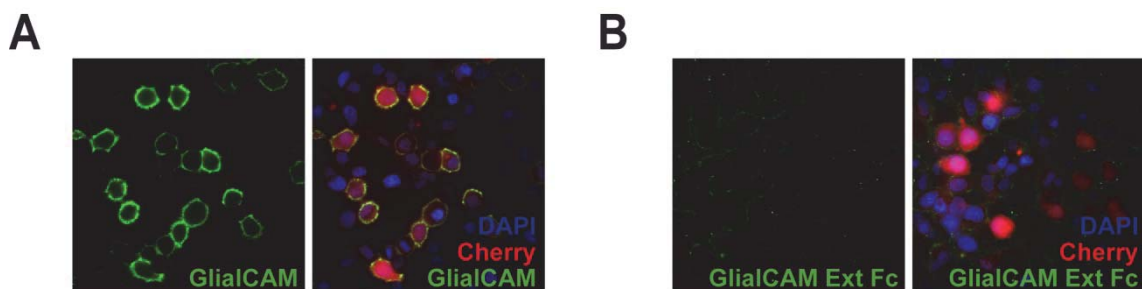


Figura 110. Assaig de *Cell Surface Binding* per detectar interacció *trans* de GlialCAM. Cèl·lules HeLa cotransfectades amb GlialCAM i Cherry, analitzades per immunofluorescència seguint la metodologia descrita. S'utilitza la proteïna Cherry com a control de les cèl·lules transfectades. S'observa en verd, el marcatge obtingut per un anticòs monoclonal comercial contra GlialCAM utilitzat com a control positiu (**A**) i el marcatge obtingut per la proteïna quimèrica GlialCAM Ext Fc (**B**). Es mostra la senyal obtinguda pels dos anticòs estudiat, juntament amb el merge que inclou la marca de Cherry (en vermell) i un marcatge de nuclis cel·lulars amb DAPI (en blau).

Es va observar que l'anticòs monoclonal contra GlialCAM mostrava un marcatge específic de les cèl·lules transfectades que expressaven GlialCAM (**Figura 110 A**). En canvi, la proteïna GlialCAM Ext Fc generava un marcatge completament inespecífic, ja

que la lleu marca que s'obtenia era igual per les cèl·lules que expressaven GlialCAM i per les que no havien estat transfectades (**Figura 110 B**).

Es van fer varies proves canviant les condicions de la metodologia i fins hi tot intentant amplificar al màxim la senyal dels anticossos amb la utilització de biotina i streptavidina, però no es van aconseguir resultats positius (Dades no mostrades).

7.3. Estudi de la interacció en *trans* de GlialCAM mitjançant la mesura d'expressió en superfície per citometria de flux.

Es sol utilitzar la citometria de flux per detectar els nivells d'expressió en superfície d'una proteïna la qual s'ha immuodetectat per la part extracel·lular. Aquesta mateixa aproximació metodològica s'ha utilitzat per identificar interaccions *trans* entre dues proteïnes (Romero et al., 2005; Sintès et al., 2007).

Es van utilitzar cèl·lules HEK control o que expressaven GlialCAM amb alts nivells d'expressió i se'ls va realitzar una immunocitoquímica seguida per la detecció de l'expressió en superfície per citometria de flux.

Per poder validar la senyal obtinguda correctament, es van utilitzar cèl·lules sense immunodetectar com a control d'autofluorescència de les HEK i cèl·lules on únicament s'havia posat l'anticòs secundari com a control d'inespecificitat de l'anticòs. Per altra banda, també es va utilitzar l'anticòs monoclonal comercial que reconeix la part extracel·lular de GlialCAM com a control positiu del mètode i diferents dilucions de GlialCAM Ext Fc per intentar validar la interacció en *trans* (**Figura 111**).

Es va observar que la metodologia funcionava, ja que l'anticòs comercial contra GlialCAM detectava l'expressió en superfície de GlialCAM en un 83% de cèl·lules transfectades, mentre que no detectava expressió en cèl·lules control (**Figura 111 E i F**). No obstant, no es va detectar interacció en *trans* ja que les condicions experimentals de GlialCAM Ext Fc (**Figura 111 H i J**) detectaven un percentatge de senyal molt baix, similar a la senyal produïda per l'anticòs secundari (**Figura 111 D**). A més a més, aquesta senyal de detecció era pròxima a la senyal obtinguda en les cèl·lules control que no expressaven GlialCAM (**Figura 111 G i I**). Per tant, la senyal que s'obtenia amb l'anticòs quimèric GlialCAM Ext Fc era senyal inespecífica del mètode.

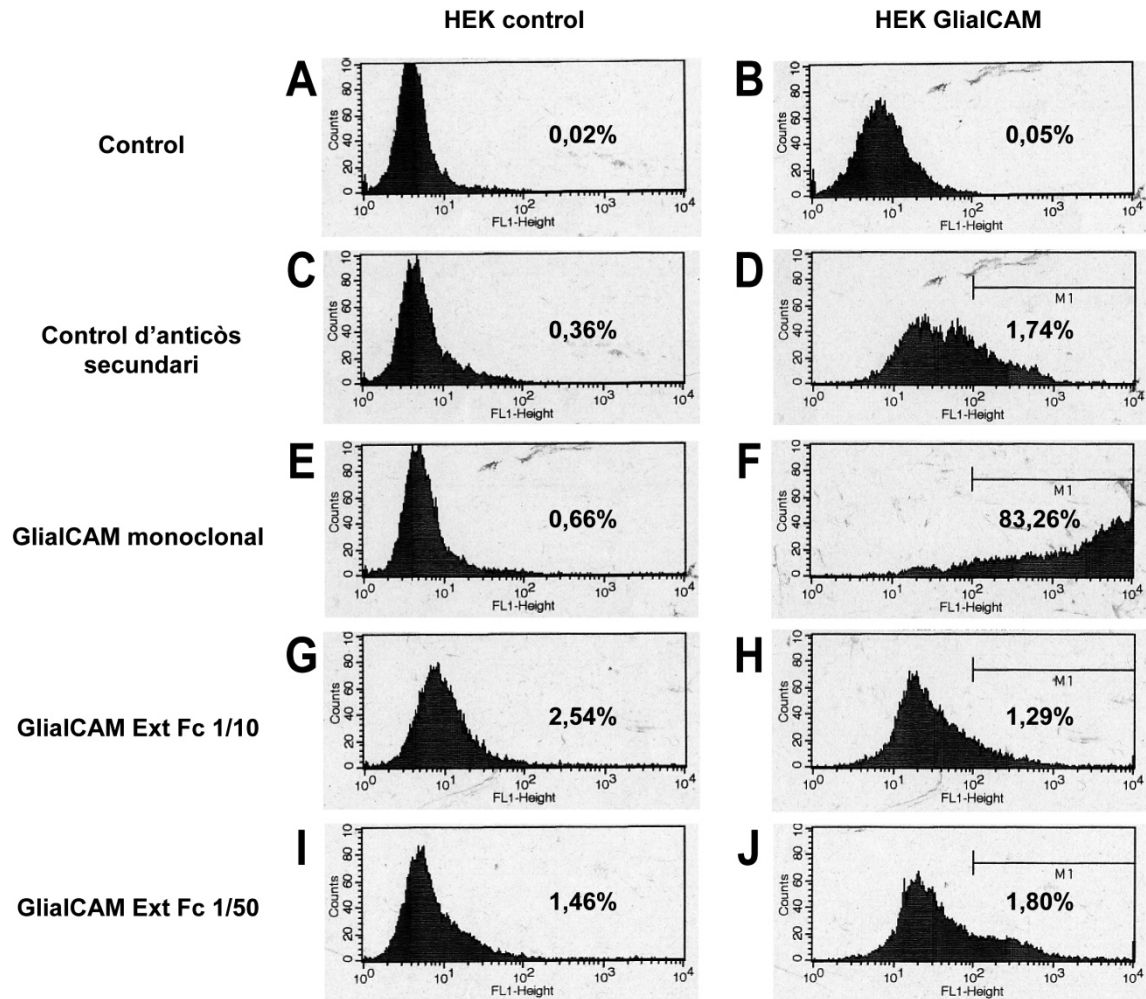


Figura 111. Assaig de mesura de l'expressió en superfície per citometria de flux. Experiment representatiu de cèl·lules HEK control (A, C, E, G, I) o que expressen GlialCAM (B, D, F, H, J), analitzades per citometria de flux. Es mostren els histogrames obtinguts amb el control negatiu (A i B), el control d'anticòs secundari (C i D), el control positiu amb l'anticòs monoclonal contra GlialCAM (E i F) i les relacions experimentals de la proteïna quimèrica GlialCAM Ext Fc diluïda 1/10 (G i H) i 1/50 (I i J). El percentatge de cèl·lules positives es mostra dins de cada histograma.

La majoria d'interaccions en *trans* descrites per aquestes i altres tècniques eren interaccions *trans* heterofiliques (Romero et al., 2005). En aquest cas, s'estava buscant descriure una interacció *trans* homofilica. Això podia suposar certs problemes, ja que si la hipòtesi era correcta i GlialCAM interacciona en *trans* amb ella mateixa pel domini extracel·lular, la proteïna quimèrica que s'havia generat podria estar agregada.

Aquesta agregació podria ser la causa dels resultats negatius obtinguts amb les dues tècniques utilitzades. Es podrien augmentar les condicions experimentals utilitzant concentracions de GlialCAM Ext Fc més diluïdes (1/200, 1/500, 1/1000) per intentar disminuir l'agregació i afavorir la interacció entre les molècules de la proteïna produïda i les molècules expressades en les cèl·lules.

7.4. Estudi de la interacció en *trans* de GlialCAM mitjançant assajos de BIACORE.

L'assaig de BIACORE es basa en unir una de les dues proteïnes per les que es vol testar la interacció, en un xip sensor de forma directa o mitjançant una molècula acobladora com el dextrà. S'introdueix aquest xip al BIACORE i es passa per l'aparell una solució que contingui l'altra proteïna per la qual es vol testar la interacció. Un cop es deixa de passar la proteïna per l'aparell, s'observa si ha quedat unida a la proteïna del xip mitjançant la senyal SPR (*surface plasmon resonance*) que monitoritza interaccions entre proteïnes en temps real (Kamisaka et al., 2011; Rahman et al., 2011) (Materials i mètodes). Tots els canvis en la senyal SPR queden registrats en un sensograma.

Es va immobilitzar la proteïna quimèrica GlialCAM Ext Fc en un dels canals del xip que es va utilitzar. Aquesta immobilització podria fer disminuir l'agregació de la proteïna i facilitar la interacció. En un altre canal es va immobilitzar la proteïna quimèrica hv284 Fc que era una proteïna de fusió que contenia la part extracel·lular de la proteïna hv284 fusionada a la fracció constant de la IgG de ratolí. Aquesta proteïna va ser cedida pel laboratori del Dr. Pablo Engel i es va utilitzar com a control d'interaccions inespecífiques. Finalment, un tercer canal del xip es va deixar sense cap proteïna immobilitzada com a control negatiu d'interaccions inespecífiques amb el xip.

Es van preparar diferents dilucions de GlialCAM Ext Fc i es van passar pel BIACORE, seguint un protocol que presentava 60 segons d'injecció de mostra (període d'associació de la proteïna) i 60 segons d'injecció de solució sense mostra (període de dissociació de la proteïna).

Les dades obtingudes en el canal que no contenia cap proteïna immobilitzada es van utilitzar com a blanc i les dades obtingudes en el canal on hi havia la proteïna hv284 Fc immobilitzada, es van utilitzar com a referència d'interacció inespecífica. Tant el blanc com la referència d'interacció inespecífica, es van restar a les dades obtingudes en el canal on hi havia immobilitzada GlialCAM Ext Fc i es van obtenir els sensogrames de la interacció en *trans* de GlialCAM (**Figura 112**).

Es va observar que durant el període d'associació els nivells d'interacció entre els dominis extracel·lulars de GlialCAM anaven augmentant, ja que el fet de passar la solució amb la proteïna GlialCAM Ext Fc feia que hi hagués un reconeixement per part de la proteïna immobilitzada al xip. Posteriorment, es va observar que en el període de

dissociació els nivells d'interacció de GlialCAM Ext Fc no disminuïen, mostrant que els canvis en l'associació de la proteïna eren estables (**Figura 112 A**). Aquest fet indicava que la proteïna era reconeguda per la proteïna del xip i quedava enganxada, per tant hi havia interacció.

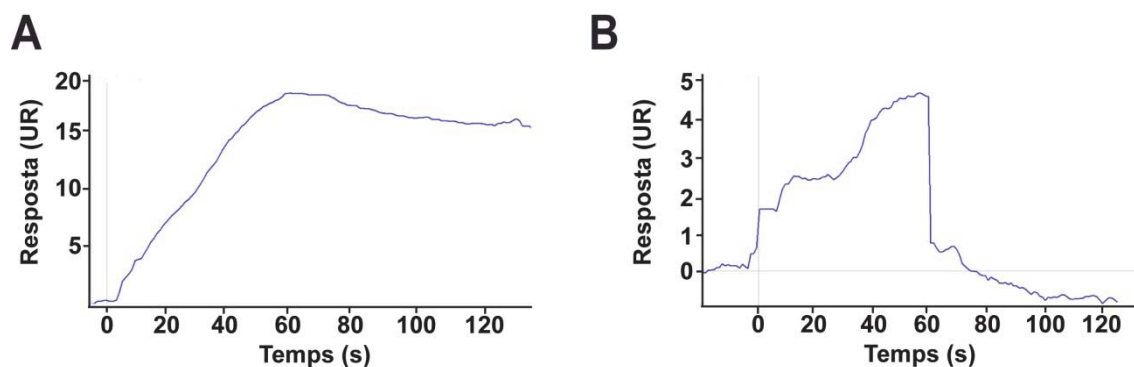


Figura 112. Assaig de BIACORE per validar la interacció *trans* de GlialCAM. **A.** Nivells d'associació entre els dominis extracel·lulars de GlialCAM, analitzats per BIACORE. Es mostra el sensograma obtingut en restar els canals de blanc i referència. **B.** Nivells d'associació entre els dominis extracel·lulars de GlialCAM després del bloqueig amb un anticòs primari contra la part extracel·lular de GlialCAM, analitzats per BIACORE. Es mostra el sensograma obtingut en restar els canals de blanc i referència. El període d'associació de proteïnes és de 0 a 60 segons mentre que el període de dissociació de proteïnes és de 60 a 120 segons.

Es va voler comprovar si la interacció observada entre les molècules de GlialCAM Ext Fc era específica. Per això, es va utilitzar l'anticòs monoclonal contra la part extracel·lular de GlialCAM per bloquejar les molècules de proteïna immobilitzada al xip. Si la interacció observada era específica, s'hauria de perdre degut al bloqueig previ efectuat per l'anticòs.

Es va regenerar el xip i es va procedir a realitzar un assaig amb un protocol on prèviament al període d'associació de la proteïna GlialCAM Ext Fc, hi havia un període de 120 segons d'injecció de l'anticòs monoclonal contra GlialCAM.

En obtenir els sensogrames corregits pels canals de blanc i referència es va observar que amb el bloqueig de l'anticòs, el període d'associació de la proteïna també mostrava un augment dels nivells de senyal però en el període de dissociació aquesta senyal es perdia completament. Aquest fet indicava que GlialCAM Ext Fc no estava reconeixent cap proteïna del xip (**Figura 112 B**). Per tant, aquests resultats van mostrar que la interacció observada en el BIACORE era específica de GlialCAM.

En aquest apartat s'han obtingut evidències de la possible interacció homofilica en *trans* de GlialCAM que succeeix a través del domini extracel·lular. S'han generat les

eines necessàries per continuar amb aquest projecte i s'han fet diversos estudis diferents que han servit per mostrar les dificultats que existeixen a l'hora de validar interaccions en *trans*. Per avançar en el coneixement d'aquest tipus d'interacció, es podria utilitzar les quimeres i delecions generades així com estudiar la possible interacció en *trans* heterofílica entre GlialCAM i MLC1 o CIC-2. És necessari però, trobar una metodologia més econòmica i fàcil per identificar interaccions en *trans* per portar a terme totes aquestes aproximacions.

8. DISCUSSIÓ.

GlialCAM és una proteïna amb una estructura típica de molècula d'adhesió semblant a la família de les IgCAMs. S'ha predit que el domini extracel·lular presenta un domini IgV i un domini IgC2 que són dominis de tipus *Ig-like*. A més a més, el domini citoplasmàtic presenta un domini d'unió a PDZ de tipus III, una zona rica en prolines i llocs potencials de fosforilació (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005). S'ha descrit que la proteïna és capaç de dimeritzar en *cis* per varies aproximacions (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005) i s'ha observat que es localitza a la membrana cel·lular concentrada a les regions de contacte entre cèl·lules en condicions d'alta confluència cel·lular (López-Hernández et al., 2011a; Moh et al., 2005).

Lògicament, qualsevol part de l'estructura de GlialCAM influeix en la localització, la interacció i la funció de la proteïna però els estudis realitzats en aquest capítol de Tesi, mostren els dominis que tenen més rellevància en cadascuna de les característiques descrites de GlialCAM.

S'ha identificat el domini extracel·lular com el domini clau per la correcta expressió de la proteïna. A més a més, aquest domini és el responsable de l'homodimerització en *cis* de GlialCAM. En aquesta regió extracel·lular mostra una major importància en el procés de dimerització el domini IgV.

També s'han obtingut evidències experimentals de la possible interacció homofílica en *trans* de la proteïna. La relació lògica entre el domini extracel·lular i aquest tipus d'interacció no s'havia descrit fins al moment degut a les dificultats tècniques a l'hora d'identificar interaccions *trans* homofíliques.

Per altra banda, s'ha identificat el domini citoplasmàtic com un domini necessari per la localització de la proteïna a les unions cel·lulars. Aquesta localització característica però, requereix que la proteïna presenti un estat d'oligomerització. Per tant, el domini

extracel·lular també és necessari per crear les condicions idònies d'oligomerització perquè la proteïna es pugui localitzar a les unions cel·lulars mitjançant el domini citoplasmàtic.

La seqüència d'unió a dominis PDZ tipus III present al domini citoplasmàtic de GlialCAM, podria facilitar la interacció amb proteïnes del citoesquelet o amb proteïnes típiques d'unions que facilitarien la localització a les unions cel·lulars. Aquests tipus d'interaccions s'observen amb les proteïnes JAM de la família de les IgCAMs amb una estructura molt semblant a GlialCAM. En aquest cas, el domini citoplasmàtic de les JAMs presenta seqüències d'unió a dominis PDZ tipus I i II que faciliten la interacció amb proteïnes d'unions cel·lulars com ZO-1 (Hirabayashi et al., 2003). A més a més, la possible interacció en *trans* de GlialCAM també podria facilitar la formació de les unions cel·lulars i la localització de la proteïna. Estudis realitzats amb les proteïnes JAM mostren que la formació d'homodímers en *cis* és estrictament necessària per la interacció en *trans* de la proteïna (Ebnet et al., 2003, 2004; Mandell et al., 2004). Aquest fet podria ser la causa que amb l'estudi de les quimeres es requereixi un estat oligomèric, ja que primer succeiria la interacció en *cis* i després la interacció en *trans* que facilitaria la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars a través de la interacció del domini citoplasmàtic amb el citoesquelet d'actina.

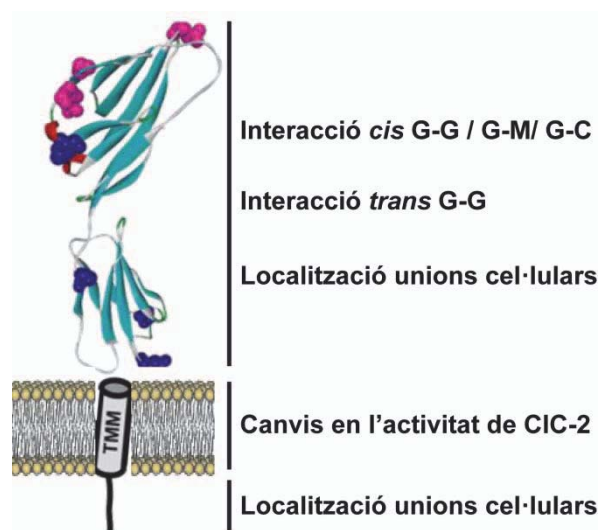


Figura 113. Esquema representatiu dels resultats obtinguts amb els estudis d'estructura-funció dels dominis de GlialCAM. Esquema de la proteïna GlialCAM on s'ha diferenciat els dominis extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic i on es mostra els processos en els quals estan implicats aquests dominis. G: GlialCAM, M: MLC1, C: CIC-2.

En els darrers anys, s'ha identificat GlialCAM com a subunitat β de MLC1 i com a subunitat auxiliar de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012; López-Hernández et al., 2011b).

Els estudis d'estructura-funció han mostrat que la interacció heterofilica en *cis* entre GlialCAM i MLC1 i entre GlialCAM i CIC-2 s'efectua a través del domini extracel·lular, amb una major implicació del domini IgV. Aquests resultats han sigut sorprenents ja que hipotetitzen que la interacció amb MLC1 i CIC-2 és pels *loops* extracel·lulars d'aquestes proteïnes. Es podrien realitzar quimeres o delecions dels diferents *loops* de MLC1 i CIC-2 per identificar la regió concreta d'interacció amb GlialCAM. En el cas de CIC-2, es podrien realitzar quimeres intercanviant els *loops* extracel·lulars amb CIC-1 o CIC-5, ja que estudis del grup han mostrat que GlialCAM interacciona bioquímicament amb CIC-1 però no amb CIC-5 mitjançant assajos de Split-TEV.

El procés de tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de GlialCAM, requereix la interacció bioquímica a través del domini extracel·lular i la característica intrínseca de GlialCAM de localitzar-se als contactes entre cèl·lules. La localització de CIC-2 a les unions per part de la delecio del domini citoplasmàtic de GlialCAM, ofereix la possibilitat que CIC-2 pugui interaccionar per si sol amb molècules del citoesquelet que el localitzin a les unions cel·lulars sense la necessitat de GlialCAM.

Finalment, els estudis funcionals han identificat que el domini responsable dels canvis en l'activitat del canal CIC-2 és el domini transmembrana de GlialCAM. S'ha descrit que GlialCAM pot activar CIC-2 mitjançant l'obertura del *common gate* (Jeworutzki et al., 2012). El *common gate* de CIC-2 actua en els dos porus del canal quan aquest es troba en estat homodimèric (Niemeyer et al., 2009) per tant, una hipòtesi seria que GlialCAM es localitzés entre mig dels homodímers de CIC-2 i canviés les característiques del canal pel domini transmembrana. Una altra opció hagués sigut que el domini citoplasmàtic de GlialCAM interaccionés funcionalment amb els dominis CBS de CIC-2, però no s'han obtingut evidències de la implicació d'aquest domini en els canvis funcionals. Els estudis de mutagènesi han servit per mapar el domini transmembrana i identificar els aminoàcids Serina241, Leucina242 i Tirosina243 com a responsables d'aquests canvis funcionals en CIC-2.

En conclusió, GlialCAM és una proteïna que forma homodímers a través del domini IgV extracel·lular que generen les condicions d'oligomerització idònies per localitzar la proteïna als contactes entre cèl·lules mitjançant la unió del domini citoplasmàtic amb el citoesquelet d'actina. Aquest procés, es podria veure afavorit per la interacció en *trans* homofilica amb molècules de GlialCAM situades a la cèl·lula amb la que s'ha format el contacte. La interacció heterofilica amb MLC1 o CIC-2 és a través del domini extracel·lular i d'alguna manera, aquesta interacció està implicada en la localització

d'aquestes proteïnes a les unions cel·lulars per part de GlialCAM. En el cas concret de CIC-2, GlialCAM provoca canvis en les característiques funcionals del canal a través dels aminoàcids localitzats a l'inici del domini transmembrana.

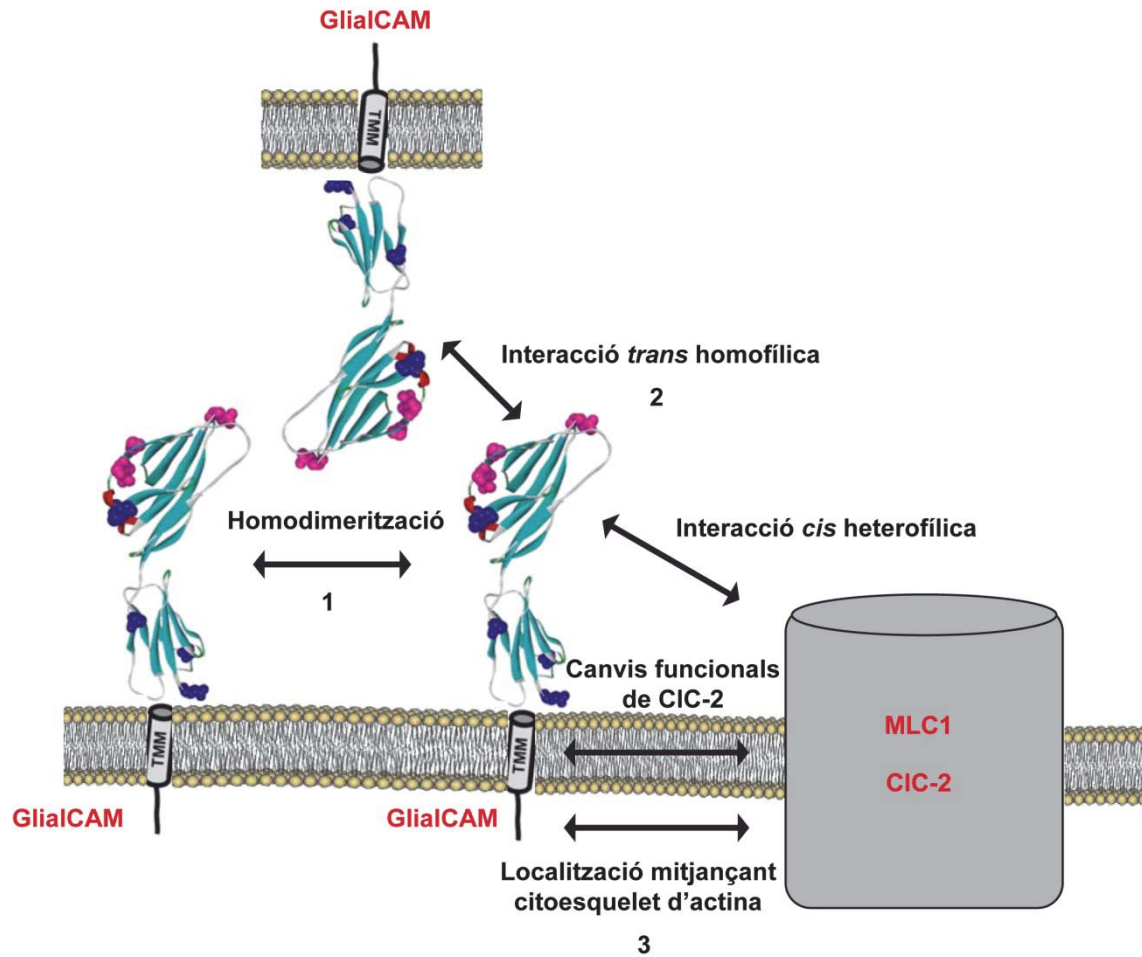


Figura 114. Possible model d'estructura-funció dels diferents dominis de GlialCAM. Es mostra la implicació de cada domini en els processos estudiats. També s'indica el possible ordre del mecanisme de localització de la proteïna a les unions cel·lulars, on primer tindria lloc l'homodimerització en *cis* de GlialCAM (1), que permetria la interacció en *trans* de la proteïna (2) i això facilitaria la localització a les unions cel·lulars mitjançant la interacció del domini citoplasmàtic amb el citoesquelet d'actina.

DISCUSSIÓ GENERAL.

Durant aquesta Tesi s'ha obtingut informació que ha permès avançar i ampliar els coneixements actuals de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals a diferents nivells i s'han desenvolupat noves eines per continuar la recerca del grup.

La identificació i anàlisi de l'interactoma de MLC1 ha permès obtenir proteïnes que podrien tenir algun tipus de relació funcional amb MLC1. Els estudis de proteòmica i la posterior validació dels resultats realitzats pel grup, han permès descriure GLT-1 i NBC com a possibles proteïnes a formar part de l'interactoma de MLC1. No obstant, es necessita seguir amb aquesta línia de recerca per obtenir més informació sobre la relació funcional de MLC1 amb GLT-1 o NBC i la implicació amb la fisiologia de MLC.

Durant el període de Tesi, els mateixos estudis de validació de l'interactoma de MLC1 han permès identificar a *GLIALCAM* com a segon gen de malaltia per MLC (López-Hernández et al., 2011a). Això ha suposat un gran avanç en el coneixement de la patologia ja que s'ha explicat la malaltia del 25% de pacients que no presentaven mutacions en *MLC1* i ha permès obrir nous projectes d'investigació sobre el coneixement de MLC.

La identificació del segon gen de malaltia i la validació de les proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de MLC1, s'ha pogut realitzar en part, gràcies a la millora i desenvolupament d'una variant del mètode de complementació de fragments de proteïnes Split-TEV realitzat en aquesta Tesi. Aquesta nova variant del mètode mostra una augmentada sensibilitat i especificitat per detectar interaccions directes entre proteïnes de membrana i representa una eina molt important per poder continuar els estudis del grup.

Per altra banda, l'obtenció de models cel·lulars d'astròcits de rata que no presenten expressió de MLC1 o de GlialCAM ha permès estudiar el mecanisme fisiopatològic de les dues proteïnes *in vitro*.

Utilitzant el model *knock-down* de MLC1 desenvolupat pel grup, s'han realitzat estudis funcionals que han pogut implicar a MLC1 en el procés de regulació del volum cel·lular, ja que la manca de MLC1 provoca una disminució del mecanisme de RVD i una disminució de l'activitat VRAC en els astròcits. A més a més, s'ha pogut descriure que fenotípicament, la manca de MLC1 provoca l'aparició de vacuoles astrocitàries. Els estudis fenotípics i funcionals del model han permès identificar MLC1 com la

molècula efectora de l'aparició de les vacuoles astrocitàries i s'ha observat que probablement siguin la conseqüència fenotípica de l'acumulació d'aigua als astròcits degut a la reducció de l'activitat VRAC provocada per la manca de MLC1. La correcta expressió i localització de MLC1 a les unions astrocitàries és indispensable per evitar l'aparició d'aquestes vacuoles intracel·lulars. A més a més, aquests estudis fenotípics *in vitro* han permès identificar el fenotip vacuolitzant astrocitari com a nova característica fenotípica dels pacients amb MLC (Duarri et al., 2011). Malgrat aquesta nova informació, no s'ha pogut descriure la funció de MLC1.

El desenvolupament i la caracterització del model *knock-down* de GlialCAM ha permès descriure una nova funció de la proteïna com a xaperona necessària per la correcta expressió i localització de MLC1 a les unions astrocitàries. La caracterització fenotípica d'aquest model amb una activitat VRAC disminuïda i vacuolització astrocitària, ha permès explicar perquè els pacients que tenen mutacions en *MLC1* i els que tenen mutacions en *GLIALCAM* presenten el mateix fenotip de la malaltia i reafirmar a MLC1 com a proteïna efectora del fenotip. Els estudis de complementació d'aquest model han mostrat que les mutacions de GlialCAM que presenten un defecte bioquímic en la interacció, no són capaces de recuperar el fenotip vacuolitzant perquè no són capaces de localitzar correctament MLC1 a les unions astrocitàries. Per altra banda, no s'ha pogut descriure cap defecte per les mutacions que no mostren defecte bioquímic ja que en aquest model es comporten com la proteïna *wild type*.

Mitjançant l'estudi dels models de complementació amb les mutacions de MLC1, s'ha pogut observar que GlialCAM és capaç de protegir-les de la retenció al reticle endoplasmàtic i localitzar-les a les unions astrocitàries. Aquesta recuperació de la localització provoca la recuperació de l'activitat VRAC i la reversió del fenotip vacuolitzant. Aquestes dades indiquen que les mutacions de MLC1 són funcionals i poden millorar el fenotip astrocitari. Això genera un punt de partida per la recerca d'un possible tractament terapèutic pels pacients de MLC.

En tots aquests estudis amb els models cel·lulars no s'ha pogut observar defectes en CIC-2 pel qual s'ha descrit GlialCAM com a subunitat auxiliar (Jeworutzki et al., 2012). Aquests estudis proposen una hipotètica competència entre MLC1 i CIC-2 per la interacció amb GlialCAM on sembla que la interacció necessària és entre MLC1 i GlialCAM, ja que la manca de GlialCAM únicament afecta a MLC1. Aquesta nova hipòtesi obre una nova línia de recerca on es podrien realitzar estudis funcionals

d'activitat, diferents models cel·lulars i estudis amb els models *knock-out* de CIC-2, MLC1 i GlialCAM per caracteritzar la relació entre aquestes tres proteïnes.

Finalment, en aquesta Tesi també s'ha avançat en el coneixement dels dominis estructurals de GlialCAM mitjançant estudis d'estructura-funció amb proteïnes quimèriques i proteïnes de fusió.

GlialCAM presenta una estructura molt semblant a les proteïnes JAM de la superfamília de les IgCAMs (Mandell and Parkos, 2005). Igual que succeeix en aquestes proteïnes, s'ha identificat el domini extracel·lular de GlialCAM com el domini responsable de l'homodimerització en *cis* i l'heterodimerització en *cis* amb MLC1 i CIC-2. Per altra banda, s'ha definit que el domini citoplasmàtic de GlialCAM és imprescindible per la localització de la proteïna a les unions cel·lulars, però requereix d'un estat oligomèric de la proteïna per tant, el domini extracel·lular també està implicat en la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars. La localització de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars per part de GlialCAM requereix de la interacció per part del domini extracel·lular i la capacitat intrínseca de GlialCAM de localitzar-se a les unions. A més a més, s'ha pogut identificar els aminoàcids del domini transmembrana de GlialCAM responsables dels canvis funcionals que provoca GlialCAM sobre CIC-2.

S'han portat a terme diferents tipus de metodologies per identificar i detectar la interacció homofílica en *trans* de GlialCAM. Els resultats obtinguts han mostrat evidències de la implicació del domini extracel·lular en aquest tipus d'interacció. La interacció en *trans* homofílica de GlialCAM podria facilitar la formació dels contactes cel·lulars i la localització de la proteïna a les unions cel·lulars. S'ha de continuar amb aquests estudis trobant una metodologia senzilla per detectar interacció en *trans*. Així es podrà caracteritzar amb més precisió aquest tipus d'interacció utilitzant les quimeres i delecions construïdes en aquesta Tesi, o es podrà estudiar la possible interacció en *trans* heterofílica entre GlialCAM i altres proteïnes.

En relació a la fisiopatologia de MLC, MLC1 i GlialCAM serien unes proteïnes necessàries pel manteniment del volum cel·lular dels astròcits que envolten els vasos sanguinis.

Per una banda, GlialCAM interacciona amb MLC1 (pel domini extracel·lular) i promou l'expressió, la sortida del reticle i la localització als contactes astrocitaris de MLC1. La localització als contactes astrocitaris pot estar afavorida per la localització i la

interacció en *trans* homofílica de GlialCAM amb molècules de la cèl·lula adjacent. Un cop localitzat correctament, MLC1 està implicat en el correcte funcionament dels mecanismes de control del volum cel·lular com el RVD mitjançant l'activació de l'activitat VRAC. Això evita l'acumulació d'aigua en els astròcits i la formació de vacuoles intracel·lulars. Així, mutacions en *MLC1* observades en pacients de MLC provoquen un defecte en els mecanismes de control del volum cel·lular perquè estan afectant directament a MLC1, i mutacions en *GLIALCAM* observades en pacients de MLC provoquen el mateix tipus de defecte perquè no s'aconsegueix localitzar a MLC1 al seu lloc d'acció. En aquest mateix model astrocitari, MLC1 i GlialCAM podrien estar formant part d'un macrocomplex proteic involucrat en diferents funcions. MLC1 podria actuar com a sensor de les condicions extracel·lulars o intracel·lulars i podria activar o inhibir diferents proteïnes efectores com podrien ser GLT-1 o NBC. GlialCAM seria la proteïna involucrada en localitzar a MLC1 correctament.

Per altra banda però, GlialCAM podria interaccionar amb més eficiència amb CIC-2 en algunes regions cerebrals. Aquesta interacció podria estar afavorida per determinades condicions fisiològiques com ara l'activitat neuronal i el conseqüent augment de K^+ extracel·lular, canvis microosmòtics, influència dels oligodendròcits, cascades de senyalització cel·lular, etc. En aquest cas, GlialCAM interaccionaria amb CIC-2 (pel domini extracel·lular) localitzant-lo a les unions cel·lulars i canviant les seves propietats de canal per mantenir-lo més actiu. Aquesta hipòtesi però, necessita més estudis per acabar descrivint les característiques fisiològiques i per involucrar a CIC-2 en la fisiopatologia de MLC.

Tots aquests resultats han obert noves possibilitats per aconseguir arribar a entendre el mecanisme fisiopatològic de MLC, així com s'han generat noves eines i noves vies d'investigació al grup.

CONCLUSIONS.

1. La nova variant desenvolupada del mètode de complementació de fragments de proteïnes Split-TEV, és un mètode eficaç per identificar interaccions entre proteïnes de membrana en cèl·lules de mamífer. Aquest nou mètode mostra una alta sensibilitat i alta especificitat mitjançant una metodologia senzilla i robusta.
2. L'estudi de l'interactoma de MLC1 ha permès identificar *GLIALCAM* com a segon gen de malaltia per MLC. Aquest fet ha permès descriure GlialCAM com a subunitat β de MLC1 i com a subunitat auxiliar de CIC-2. Per altra banda, es necessita continuar la investigació per trobar la relació funcional entre MLC1 i GLT-1 o NBC.
3. GlialCAM actua com a xaperona de MLC1 necessària per la sortida del reticle i per la localització de MLC1 a les unions astrocitàries. Les mutacions en *GLIALCAM* que mostren un defecte bioquímic, no són capaces de localitzar correctament MLC1 a aquestes unions. Aquesta nova funció de GlialCAM explica la igualtat fenotípica entre els pacients de MLC que presenten mutacions en *MLC1* i els que presenten mutacions en *GLIALCAM*.
4. MLC1 és la proteïna responsable del fenotip vacuolitzant astrocitari en els pacients amb MLC. Aquest fenotip és degut probablement a l'augment del contingut d'aigua intracel·lular causat per una disminució de l'activitat VRAC i del mecanisme de RVD. Tot i així, encara no es coneix la funció exacta de MLC1.
5. Algunes mutacions de *MLC1* són capaces de recuperar l'activitat VRAC i revertir el fenotip vacuolitzant astrocitari mostrant-se funcionals quan es localitzen a les unions cel·lulars. Aquest resultat representa un punt de partida per la recerca d'una possible teràpia pels pacients de MLC.
6. GlialCAM homodimeritza amb si mateixa i heterodimeritza amb MLC1 i CIC-2 en *cis* a través del domini extracel·lular. S'han observat evidències que aquest domini també es capaç de formar interaccions *trans* homofíliques. El domini citoplasmàtic de GlialCAM és necessari per localitzar la proteïna a les unions cel·lulars. Els primers aminoàcids del domini transmembrana de GlialCAM són els responsables dels canvis en les característiques funcionals de CIC-2.

BIBLIOGRAFIA.

Abrams, C.K., and Scherer, S.S. (2012). Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818, 2030–2047.

Alwine, J.C. (1985). Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Molecular and Cellular Biology* 5, 1034–1042.

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. *Molecular and Cellular Neurosciences* 37, 480–493.

Amédée, T., Robert, A., and Coles, J.A. (1997). Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia* 21, 46–55.

Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.

Annunziato, L., Boscia, F., and Pignataro, G. (2013). Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*.

Ballanyi, K., Grafe, P., Serve, G., and Schlue, W.R. (1990). Electrophysiological measurements of volume changes in leech neuropile glial cells. *Glia* 3, 151–158.

Baorto, D.M., Mellado, W., and Shelanski, M.L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *The Journal of Cell Biology* 117, 357–367.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

Bay, V., and Butt, A.M. (2012). Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* 60, 651–660.

Beard, N.A., Laver, D.R., and Dulhunty, A.F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 85, 33–69.

Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., and Jendrach, M. (2005). TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *Journal of Cell Science* 118, 2435–2440.

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. *European Journal of Cell Biology* 88, 141–152.

Benarroch, E.E. (2005). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clinic* 80, 1326–1338.

Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M., and Anderova, M. (2012). Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One* 7, e29725.

Benfenati, V., and Ferroni, S. (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168, 926–940.

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. *Journal of Neurochemistry* 100, 87–104.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2563–2568.

Ben-Zeev, B., Levy-Nissenbaum, E., Lahat, H., Anikster, Y., Shinar, Y., Brand, N., Gross-Tzur, V., MacGregor, D., Sidi, R., Kleit, 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. *Human Genetics* 111, 214–218.
- Van den Berg, S., Löfdahl, P.-A., Härd, T., and Berglund, H. (2006). Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of Biotechnology* 121, 291–298.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* 226, 735–745.
- 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, 1251–1264.
- Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.-E., Nielsen, M., Foster, L.J., and Mann, M. (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nature Biotechnology* 21, 315–318.
- 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. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 6581–6589.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A.J., 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.
- Bodnár, A., Nizsalóczy, E., Mocsár, G., Szalóki, N., Waldmann, T.A., Damjanovich, S., and Vámosi, G. (2008). A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunology Letters* 116, 117–125.
- Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63, 1945–1961.
- Boisseau, S., Kunert-Keil, C., Lucke, S., and Bouron, A. (2009). Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex. *Histochemistry and Cell Biology* 131, 355–363.
- Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., Van der Valk, P., Pronk, J.C., Van Horssen, 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 Neuropathologica* 114, 403–410.
- Boor, P.K.I., De Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B.M., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C., and Van der Knaap, M.S. (2005). MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64, 412–419.
- 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(-) channel disruption. *The EMBO Journal* 20, 1289–1299.
- Bossi, E., Fabbrini, M.S., and Ceriotti, A. (2007). Exogenous protein expression in *Xenopus* oocytes: basic procedures. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 375, 107–131.
- Boucard, A.A., Chubykin, A.A., Comoletti, D., Taylor, P., and Südhof, T.C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48, 229–236.
- Boute, N., Jockers, R., and Issad, T. (2002). The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 351–354.
- 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. *Human Molecular Genetics* 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, 137–142.
- Bugiani, M., Moroni, I., Bizzi, A., Nardocci, N., Bettecken, T., Gärtner, J., and Uziel, G. (2003). Consciousness disturbances in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Neuropediatrics* 34, 211–214.
- Canals, M., Burgueño, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L., Ferré, S., Bouvier, M., Fuxe, K., et al. (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Neurochemistry* 88, 726–734.
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Ciruela, F., and Estévez, R. (2012). A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells. *Analytical Biochemistry* 423, 109–118.
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I., et al. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nature Methods* 5, 727–733.
- Chapman-Smith, A., and Cronan, J.E. (1999). Molecular biology of biotin attachment to proteins. *The Journal of Nutrition* 129, 477S–484S.
- 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. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, 15769–15777.
- Choi, H.B., Gordon, G.R.J., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R.L., Martinez, J., Milner, T. a, Ryu, J.K., McLarnon, J.G., Tresguerres, M., et al. (2012). Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron* 75, 1094–1104.
- Ciruela, F. (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 338–343.
- Ciruela, F., Gómez-Soler, M., Guidolin, D., Borroto-Escuela, D.O., Agnati, L.F., Fuxe, K., and Fernández-Dueñas, V. (2011). Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1808, 1245–1255.
- 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, 287–297.
- Comes, N., Abad, E., Morales, M., Borrás, T., Gual, A., and Gasull, X. (2006). Identification and functional characterization of CIC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research* 83, 877–889.
- Cooper, M.A. (2002). Optical biosensors in drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* 1, 515–528.
- Cronan, J.E. (2005). Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 416–418.
- Crowe, W.E., Altamirano, J., Huerto, L., and Alvarez-Leefmans, F.J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* 69, 283–296.
- Cusick, M.E., Klitgord, N., Vidal, M., and Hill, D.E. (2005). Interactome: gateway into systems biology. *Human Molecular Genetics* 14 Spec No, R171–81.
- Deissler, H., Kuhn, E.-M., Lang, G.E., and Deissler, H. (2007). Tetraspanin CD9 is involved in the migration of retinal microvascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 20, 643–652.

- Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., Van Berkel, C., Polder, E., Tollard, E., Darios, F., et al. (2013). Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *The Lancet Neurology* 4422, 11–17.
- 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. *Journal of Neurochemistry* 103, 2620–2628.
- Djannatian, M.S., Galinski, S., Fischer, T.M., and Rossner, M.J. (2011). Studying G protein-coupled receptor activation using split-tobacco etch virus assays. *Analytical Biochemistry* 412, 141–152.
- Duarri, A., Teijido, O., López-Hernández, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martínez, A., et al. (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Human Molecular Genetics* 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. *Neurobiology of Disease* 43, 228–238.
- 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. *Journal of Cell Science* 116, 3879–3891.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of Cell Science* 117, 19–29.
- 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. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 288, C1451–60.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 113–120.
- 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.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.
- Ford, P., Rivarola, V., Chara, O., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Farman, N., Parisi, M., and Capurro, C. (2005). Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 97, 687–697.
- Fowler, M.A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E.D., Phillips, C.W., and Cooper, D.C. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS One* 2, e573.
- Gagnon, K.B.E., Adragna, N.C., Fyffe, R.E.W., and Lauf, P.K. (2007). Characterization of glial cell K-Cl cotransport. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 20, 121–130.
- 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 Expression and Purification* 58, 94–102.
- Giaume, C., and Venance, L. (1995). Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 2, 335–345.

Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S., and Anderson, D.M. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *The EMBO Journal* 14, 3654–3663.

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, 878–882.

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. *The Journal of General Virology* 36, 59–74.

Gray, D.C., Mahrus, S., and Wells, J.A. (2010). Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* 142, 637–646.

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. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 6473–6477.

Hamann, S., Kiilgaard, J.F., Litman, T., Alvarez-leefmans, F.J., Winther, B.R., and Zeuthen, T. (2002). Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence. 12.

Hamann, S., Herrera-Perez, J.J., Bundgaard, M., Alvarez-Leefmans, F.J., and Zeuthen, T. (2005). Water permeability of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters in mammalian epithelial cells. *The Journal of Physiology* 568, 123–135.

Hepp, R., Tricoire, L., Hu, E., Gervasi, N., Paupardin-Tritsch, D., Lambolez, B., and Vincent, P. (2007). Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *Journal of Neurochemistry* 102, 1875–1886.

Heuser, K., Eid, T., Lauritzen, F., Thoren, A.E., Vindedal, G.F., Taubøll, E., Gjerstad, L., Spencer, D.D., Ottersen, O.P., Nagelhus, E.A., et al. (2012). Loss of perivascular Kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71, 814–825.

Hirabayashi, S., Tajima, M., Yao, I., Nishimura, W., Mori, H., and Hata, Y. (2003). JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4267–4282.

Jansen, G., Määttänen, P., Denisov, A.Y., Scarffe, L., Schade, B., Balghi, H., Dejgaard, K., Chen, L.Y., Muller, W.J., Gehring, K., et al. (2012). An interaction map of endoplasmic reticulum chaperones and foldases. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11, 710–723.

Jayakumar, A.R., and Norenberg, M.D. (2010). The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metabolic Brain Disease* 25, 31–38.

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. *Journal of Neurochemistry* 117, 437–448.

Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A.A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews* 82, 503–568.

Jentsch, T.J., Poët, M., Fuhrmann, J.C., and Zdebik, A.A. (2005). Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annual Review of Physiology* 67, 779–807.

Jeworutzki, E., López-Hernández, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Müller, C.S., Schulte, U., et al. (2012). GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a ClC-2 Cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron* 73, 951–961.

Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *American Journal of Medical Genetics. Part B*,

Neuropsychiatric Genetics : the Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics 125B, 31–37.

Kamisaka, Y., Goto, R., Shibakami, M., Yoshioka, K., and Sato, Y. (2011). Surface Plasmon Resonance Analysis of Interactions between Diacylglycerol Acyltransferase and Its Interacting Molecules. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 1135–1139.

Kanai, Y., and Hediger, M.A. (2004). The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 447, 469–479.

Kapust, R.B., Tózsér, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Engineering* 14, 993–1000.

Kapust, R.B., Tózsér, J., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 949–955.

Kimelberg, H.K. (2004a). Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 129, 851–860.

Kimelberg, H.K. (2004b). Increased release of excitatory amino acids by the actions of ATP and peroxynitrite on volume-regulated anion channels (VRACs) in astrocytes. *Neurochemistry International* 45, 511–519.

Kimelberg, H.K. (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50, 389–397.

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. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 10, 1583–1591.

Kimelberg, H.K., Macvicar, B.A., and Sontheimer, H. (2006). Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54, 747–757.

Klopfleisch, R., Klose, P., Da Costa, A., Brunberg, L., and Gruber, A.D. (2010). HEPACAM1 and 2 are differentially regulated in canine mammary adenomas and carcinomas and its lymph node metastases. *BMC Veterinary Research* 6, 15.

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. *Annals of Neurology* 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 Neuropathologica* 92, 206–212.

Van der Knaap, M.S., Lai, V., Köhler, W., Salih, M.A., Fonseca, M.-J., Benke, T.A., Wilson, C., Jayakar, P., Aine, M., Dom, L., et al. (2010). Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Annals of Neurology* 67, 834–837.

Van der Knaap, M.S., Boor, I., and Estévez, R. (2012). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homeostasis. *Lancet Neurology* 11, 973–985.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology : CB* 12, 735–739.

- Lalonde, S., Ehrhardt, D.W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S.Y., and Frommer, W.B. (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 53, 610–635.
- 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. *Neurobiology of Disease* 37, 581–595.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Molinari, P., Visentin, S., De Nuccio, C., Macchia, G., Aiello, C., Bertini, E., Aloisi, F., Petrucci, T.C., et al. (2012). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 functionally cooperates with the TRPV4 cation channel to activate the response of astrocytes to osmotic stress: dysregulation by pathological mutations. *Human Molecular Genetics* 21, 2166–2180.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* 58, 913–949.
- 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. *Journal of Cellular Biochemistry* 107, 1129–1138.
- 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. *American Journal of Human Genetics* 68, 831–838.
- Leegwater, P.A.J., Boor, P.K.I., Yuan, B.Q., Van der Steen, J., Visser, A., Könst, A.A.M., Oudejans, C.B.M., Schutgens, R.B.H., Pronk, J.C., and Van der Knaap, M.S. (2002). Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Human Genetics* 110, 279–283.
- Liedtke, W., Edelman, 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, 607–615.
- 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, 343–357.
- 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. *American Journal of Human Genetics* 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. *Human Molecular Genetics* 20, 3266–3277.
- Lorenz, C., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13362–13366.
- MacAulay, N., and Zeuthen, T. (2010). Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* 168, 941–956.
- MacAulay, N., Gether, U., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T. (2001). Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology* 530, 367–378.
- 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 Therapy* 13, 696–705.

- Makara, J.K., Rappert, A., Matthias, K., Steinhäuser, C., Spät, A., and Kettenmann, H. (2003). Astrocytes from mouse brain slices express CIC-2-mediated Cl⁻ currents regulated during development and after injury. *Molecular and Cellular Neurosciences* 23, 521–530.
- Malarkey, E.B., Ni, Y., and Parpura, V. (2008). Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56, 821–835.
- Mandell, K.J., and Parkos, C.A. (2005). The JAM family of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 857–867.
- Mandell, K.J., McCall, I.C., and Parkos, C.A. (2004). Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 16254–16262.
- Matthews, C. a, Shaw, J.E., Hooper, J. a, Young, I.G., Crouch, M.F., and Campbell, H.D. (2007). Expression and evolution of the mammalian brain gene Ttyh1. *Journal of Neurochemistry* 100, 693–707.
- McCarthy, K.D., and De Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of Cell Biology* 85, 890–902.
- 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. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, 10984–10991.
- Moghaddam, B., and Adams, R.N. (1987). Regional differences in resting extracellular potassium levels of rat brain. *Brain Research* 406, 337–340.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 27366–27374.
- 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. *Journal of Cellular Physiology* 219, 382–391.
- 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. *Human Mutation* 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 in Plant Science* 13, 183–191.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2006). VRACs CARVe a path for novel mechanisms of communication in the CNS. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2006, pe42.
- Musa-Aziz, R., Boron, W.F., and Parker, M.D. (2010). Using fluorometry and ion-sensitive microelectrodes to study the functional expression of heterologously-expressed ion channels and transporters in *Xenopus* oocytes. *Methods (San Diego, Calif.)* 51, 134–145.
- 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 Research. Brain Research Reviews* 47, 191–215.
- Ngounou Wetie, A.G., Sokolowska, I., Woods, A.G., Roy, U., Deinhardt, K., and Darie, C.C. (2013). Protein–protein interactions: switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- 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 Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1674–1676.

Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Yusef, Y.R., Briones, R., and Sepúlveda, F. V (2009). Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a CIC chloride channel by extracellular protons. *The Journal of Physiology* 587, 1387–1400.

Nilius, B., and Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica* 177, 119–147.

Nooren, I.M.A., and Thornton, J.M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal* 22, 3486–3492.

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences* 29, 547–553.

Ong, S.-E., and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature Protocols* 1, 2650–2660.

Ong, S.-E., and Mann, M. (2007). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 359, 37–52.

Østby, I., Øyehaug, L., Einevoll, G.T., Nagelhus, E.A., Plahte, E., Zeuthen, T., Lloyd, C.M., Ottersen, O.P., and Omholt, S.W. (2009). Astrocytic mechanisms explaining neural-activity-induced shrinkage of extraneuronal space. *PLoS Computational Biology* 5, e1000272.

Pan, Z., Yang, H., Mergler, S., Liu, H., Tachado, S.D., Zhang, F., Kao, W.W.Y., 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, 374–385.

Parkerson, K.A., and Sontheimer, H. (2004). Biophysical and pharmacological characterization of hypotonically activated chloride currents in cortical astrocytes. *Glia* 46, 419–436.

Pasantes-Morales, H., and Martín del Río, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. *Progress in Clinical and Biological Research* 351, 317–328.

Pasantes-Morales, H., Cardin, V., and Tuz, K. (2000). Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochemical Research* 25, 1301–1314.

Pasantes-Morales, H., Lezama, R.A., Ramos-Mandujano, G., and Tuz, K.L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *The American Journal of Medicine* 119, S4–11.

Pascual-Castroviejo, I., Van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., García-Segura, J.M., Gutiérrez-Molina, M., and Pascual-Pascual, S.I. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurología (Barcelona, Spain)* 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., Megarbané, A., et al. (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534–537.

Pawlak, J., Brito, V., Küppers, E., and Beyer, C. (2005). Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Research. Molecular Brain Research* 138, 1–7.

Petschnigg, J., Moe, O.W., and Stagljar, I. (2011a). Using yeast as a model to study membrane proteins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 20, 425–432.

Petschnigg, J., Snider, J., and Stagljar, I. (2011b). Interactive proteomics research technologies: recent applications and advances. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 50–58.

Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Peters, H.K., Kapust, R.B., Li, M., Wlodawer, A., and Waugh, D.S. (2002). Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 50564–50572.

Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., and Palacín, M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 19738–19744.

Rahman, S., Arai, S., Saijo, S., Yamato, I., and Murata, T. (2011). Sarkosyl is a good regeneration reagent for studies on vacuolar-type ATPase subunit interactions in Biacore experiments. *Analytical Biochemistry* 418, 301–303.

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. *The Journal of Comparative Neurology* 388, 265–292.

Reichmann, D., Rahat, O., Cohen, M., Neuvirth, H., and Schreiber, G. (2007). The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Current Opinion in Structural Biology* 17, 67–76.

Reisinger, V., and Eichacker, L.A. (2006). Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics* 6 Suppl 2, 6–15.

Remy, I., and Michnick, S.W. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nature Methods* 3, 977–979.

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. *Journal of Neurocytology* 20, 216–224.

Ribeiro, M. de C., Hirt, L., Bogousslavsky, J., Regli, L., and Badaut, J. (2006). Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Research* 83, 1231–1240.

Ridder, M.C., Boor, I., Lodder, J.C., Postma, N.L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A.B., Estévez, R., Scheper, G.C., Mansvelter, H.D., et al. (2011). Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain : a Journal of Neurology* 134, 3342–3354.

Romero, X., Zapater, N., Calvo, M., Kalko, S.G., De la Fuente, M.A., Tovar, V., Ockeloen, C., Pizcueta, P., and Engel, P. (2005). CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174, 7033–7042.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 196, 801–810.

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 Müller cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 21866–21872.

Rutledge, E.M., and Kimelberg, H.K. (1996). Release of [3H]-D-aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 16, 7803–7811.

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 leucoencephalopathy with subcortical cysts (van der Knaap disease): molecular genetic study. *Brain & Development* 25, 362–366.

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 (New York, N.Y.)* 239, 487–491.

Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). Can molecules explain long-term potentiation? *Nature Neuroscience* 2, 597–604.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463–5467.

Sargiannidou, I., Markoullis, K., and Kleopa, K.A. (2010). Molecular mechanisms of gap junction mutations in myelinating cells. *Histology and Histopathology* 25, 1191–1206.

Saugier-Verber, P., Doummar, D., Barthez, M.-A., Czernecki, V., Drouot, N., Apartis, E., Bürglen, L., Frebourg, T., and Roze, E. (2010). Myoclonus dystonia plus syndrome due to a novel 7q21 microdeletion. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 152A, 1244–1249.

Schägger, H., and Von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223–231.

Scheper, G.C., Van Berkel, C.G.M., Leisle, L., De Groot, K.E., Errami, A., Jentsch, T.J., and Van der Knaap, M.S. (2010). Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 14, 255–257.

Schmitt, B.M., Berger, U. V, Douglas, R.M., Bevensee, M.O., Hediger, M. a, Haddad, G.G., and Boron, W.F. (2000). Na/HCO₃ cotransporters in rat brain: expression in glia, neurons, and choroid plexus. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 6839–6848.

Seifert, G., Hüttmann, K., Binder, D.K., Hartmann, C., Wyczynski, A., Neusch, C., and Steinhäuser, C. (2009). Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, 7474–7488.

Sen, E., and Levison, S.W. (2006). Astrocytes and developmental white matter disorders. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 12, 97–104.

Sener, R.N. (2003a). Leukoencephalopathy with patchy lesions, temporal cystic degeneration, and normal head size. *Computerized Medical Imaging and Graphics : the Official Journal of the Computerized Medical Imaging Society* 27, 87–91.

Sener, R.N. (2003b). Proton MR spectroscopy demonstration of taurine peaks in megalencephalic leukoencephalopathy with cysts. *Computerized Medical Imaging and Graphics : the Official Journal of the Computerized Medical Imaging Society* 27, 23–26.

Shestopalov, V.I., and Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 65, 376–394.

Sík, 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., Gursahani, R.D., Udani, V.P., and Biniwale, A.A. (1996). Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatric Neurology* 14, 291–296.

Singhal, B.S., Gorospe, J.R., and Naidu, S. (2003). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Journal of Child Neurology* 18, 646–652.

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, 355–362.

- Smirle, J., Au, C.E., Jain, M., Dejgaard, K., Nilsson, T., and Bergeron, J. (2013). Cell biology of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus through proteomics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a015073.
- Snider, J., Kittanakom, S., Curak, J., and Stagljar, I. (2010a). Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: a powerful tool for identifying protein-protein interactions. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE.
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., and Stagljar, I. (2010b). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nature Protocols* 5, 1281–1293.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods* 3, 995–1000.
- Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G.T., and Verkman, A.S. (2004). Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 286, C426–32.
- Song, X., Zhao, Y., Narcisse, L., Duffy, H., Kress, Y., Lee, S., and Brosnan, C.F. (2005). Canonical transient receptor potential channel 4 (TRPC4) co-localizes with the scaffolding protein ZO-1 in human fetal astrocytes in culture. *Glia* 49, 418–429.
- Van Steensel, B., and Henikoff, S. (2000). Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nature Biotechnology* 18, 424–428.
- De Stefano, N., Balestri, P., Dotti, M.T., Grosso, S., Mortilla, M., Morgese, G., and Federico, A. (2001). Severe metabolic abnormalities in the white matter of patients with vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. A proton MR spectroscopic imaging study. *Journal of Neurology* 248, 403–409.
- Su, G., Kintner, D.B., Flagella, M., Shull, G.E., and Sun, D. (2002a). Astrocytes from Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282, C1147–60.
- Su, G., Kintner, D.B., and Sun, D. (2002b). Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)-induced swelling and EAA release in astrocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282, C1136–46.
- Suzuki, M., and Mizuno, A. (2004). A novel human Cl(-) channel family related to Drosophila flightless locus. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 22461–22468.
- Suzuki, M., and Raisman, G. (1994). Multifocal pattern of postnatal development of the macroglial framework of the rat fimbria. *Glia* 12, 294–308.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science (New York, N.Y.)* 276, 1699–1702.
- 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. *Human Molecular Genetics* 13, 2581–2594.
- 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. *Neurobiology of Disease* 26, 532–545.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews* 88, 983–1008.

- Tingaud-Sequeira, A., Chauvigné, F., Fabra, M., Lozano, J., Raldúa, D., and Cerdà, J. (2008). Structural and functional divergence of two fish aquaporin-1 water channels following teleost-specific gene duplication. *BMC Evolutionary Biology* 8, 259.
- Tingaud-Sequeira, A., Calusinska, M., Finn, R.N., Chauvigné, F., Lozano, J., and Cerdà, J. (2010). The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evolutionary Biology* 10, 38.
- Togashi, H., Sakisaka, T., and Takai, Y. Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion & Migration* 3, 29–35.
- 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 & Development* 20, 142–153.
- Topçu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalçinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Ozguc, M., and Seboun, E. (2000). Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *American Journal of Human Genetics* 66, 733–739.
- Tözsér, J., Tropea, J.E., Cherry, S., Bagossi, P., Copeland, T.D., Wlodawer, A., and Waugh, D.S. (2005). Comparison of the substrate specificity of two potyvirus proteases. *The FEBS Journal* 272, 514–523.
- 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. *Journal of Human Genetics* 48, 605–608.
- Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* 141, 1068–1079.
- Vázquez-Juárez, E., Ramos-Mandujano, G., Hernández-Benítez, R., and Pasantes-Morales, H. (2008). On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 21, 1–14.
- Vogt, A., Hormuzdi, S.G., and Monyer, H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 141, 113–120.
- Walhout, A.J., and Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods (San Diego, Calif.)* 24, 297–306.
- 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). *Journal of Human Genetics* 56, 138–142.
- 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. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, 9244–9249.
- Wehr, M.C., Laage, R., Bolz, U., Fischer, T.M., Grünewald, S., Scheek, S., Bach, A., Nave, K.-A., and Rossner, M.J. (2006). Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nature Methods* 3, 985–993.
- 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 Biotechnology* 8, 55.
- Weibrecht, I., Leuchowius, K.-J., Clausson, C.-M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W.M., Kamali-Moghaddam, M., and Söderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Review of Proteomics* 7, 401–409.
- Weinrich, D., Jonkheijm, P., Niemeyer, C.M., and Waldmann, H. (2009). Applications of protein biochips in biomedical and biotechnological research. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48, 7744–7751.

Williamson, M.P., and Sutcliffe, M.J. (2010). Protein-protein interactions. *Biochemical Society Transactions* 38, 875–878.

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.

Yalçinkaya, C., Yüksel, A., Comu, S., Kiliç, G., Cokar, O., and Dervent, A. (2003). Epilepsy in vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Seizure: the Journal of the British Epilepsy Association* 12, 388–396.

Yamagata, M., Sanes, J.R., and Weiner, J.A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 621–632.

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. *The Journal of Cell Biology* 147, 1195–1204.

Yamane, Y., Shiga, H., Asou, H., and Ito, E. (2002). GAP junctional channel inhibition alters actin organization and calcium propagation in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 112, 593–603.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.

Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811–818.

Yiş, U., Scheper, G.C., Uran, N., Unalp, A., Cakmakçi, H., Hiz-Kurul, S., Dirik, E., and Van der Knaap, M.S. Two cases with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts and MLC1 mutations in the Turkish population. *The Turkish Journal of Pediatrics* 52, 179–183.

Yu, X., Schneiderhan-Marra, N., and Joos, T.O. (2010). Protein microarrays for personalized medicine. *Clinical Chemistry* 56, 376–387.

Yüzbaşıoğlu, A., Topçu, M., Cetin Kocaefe, Y., and Ozgüç, M. Novel mutations of the MLC1 gene in Turkish patients. *European Journal of Medical Genetics* 54, 281–283.

Zador, Z., Bloch, O., Yao, X., and Manley, G.T. (2007). Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Progress in Brain Research* 161, 185–194.

Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., and Manley, G.T. (2009). Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology* 159–170.

Zappalà, A., Li Volti, G., Serapide, M.F., Pellitteri, R., Falchi, M., La Delia, F., Cicirata, V., and Cicirata, F. (2007). Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. *Neuroscience* 148, 653–667.

Zeuthen, T. (1994). Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *The Journal of Physiology* 478 (Pt 2), 203–219.

Zeuthen, T., Zeuthen, E., and Macaulay, N. (2007). Water transport by GLUT2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Physiology* 579, 345–361.

Zhang, H., and Verkman, A.S. (2008). Aquaporin-4 independent Kir4.1 K⁺ channel function in brain glial cells. *Molecular and Cellular Neurosciences* 37, 1–10.

Zhang, C., Atasoy, D., Araç, D., Yang, X., Fucillo, M. V., Robison, A.J., Ko, J., Brunger, A.T., and Südhof, T.C. (2010). Neurexins physically and functionally interact with GABA(A) receptors. *Neuron* 66, 403–416.

Zhang, Q.-L., Luo, C.-L., Wu, X.-H., Wang, C.-Y., Xu, X., Zhang, Y.-Y., Liu, Q., and Shen, S.-L. (2011). HepaCAM induces G1 phase arrest and promotes c-Myc degradation in human renal cell carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 2910–2919.

Zhang, Y., Zhang, H., Feustel, P.J., and Kimelberg, H.K. (2008). 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. *Experimental Neurology* 210, 514–520.

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. *The Journal of Physiology* 560, 123–136.

ANNEX: ARTICLES PUBLICATS.

**Mutant GlialCAM Causes Megalencephalic
Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts, Benign Familial
Macrocephaly, and Macrocephaly with Retardation and Autism**

**Article publicat l'abril del 2011 a la revista The American
Journal of Human Genetics.**

Contribució:

Construcció de les mutacions de GlialCAM.

ARTICLE

Mutant GlialCAM Causes Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts, Benign Familial Macrocephaly, and Macrocephaly with Retardation and Autism

Tania López-Hernández,^{1,9} Margreet C. Ridder,^{3,9} Marisol Montolio,^{1,4} Xavier Capdevila-Nortes,¹ Emiel Polder,³ Sònia Sirisi,^{1,6} Anna Duarri,^{1,4} Uwe Schulte,⁷ Bernd Fakler,⁷ Virginia Nunes,^{2,5,6} Gert C. Scheper,³ Albert Martínez,⁸ Raúl Estévez,^{1,4,10,*} and Marjo S. van der Knaap^{3,10,*}

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.¹ 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).¹ In follow-up exams, the white matter abnormalities remain and atrophy ensues.¹ 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.² In 2001, we demonstrated that mutations in *MLC1* (MIM 605908) cause MLC.³ *MLC1* mutations are found in approximately 75% of the MLC patients.⁴ MLC1 is an oligomeric membrane protein that is expressed almost exclusively in the brain. It has some degree of homology to ion channels.^{5,6} 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.⁵⁻⁷ Thus far, the physiological role of MLC1 has remained unknown, and a suggested role in ion transport has not been confirmed.^{3,5,8}

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,^{9,10} but genetic-linkage studies failed to identify another disease gene. We recently described two distinct phenotypes among MLC patients without *MLC1* mutations.¹¹ The classical phenotype retains typical clinical and MRI features, as seen in patients with *MLC1* mutations.^{1,11} 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).¹¹

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.

¹Sección de Fisiología, ²Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; ³Department of Child Neurology, VU University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands; ⁴Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-750, ⁵Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-730, ISCIII, 08907 Barcelona, Spain; ⁶Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, 08907 Barcelona, Spain; ⁷Logopharm GmbH, Engesserstrasse 4, 79108 Freiburg, Germany; ⁸Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Institute for Research in Biomedicine, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain

⁹These authors contributed equally to this work

¹⁰These authors contributed equally to this work

*Correspondence: restvez@ub.edu (R.E.), 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.¹² 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 solubilisate and pellet fractions. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were probed with rabbit polyclonal antibodies (α -N1 or α -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 (α -N1 and α -N2) and the α -NH (anti-N-terminus of human MLC1) antibody were generated and characterized previously.^{5,7,13} The α -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 solubilisate (rat or mouse) was incubated for 2 hr at 4°C with 20 μ g of the respective immobilized antibody¹³ (α -N1, α -N2 α -NH, α -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.¹⁴ 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 μ 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.¹⁵ Extracted peptides dissolved in 0.5% trifluoroacetic acid were loaded on a precolumn (C18 PepMap100, 5 μ 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 μ 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 methods¹⁶ 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_{norm} 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.¹ 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

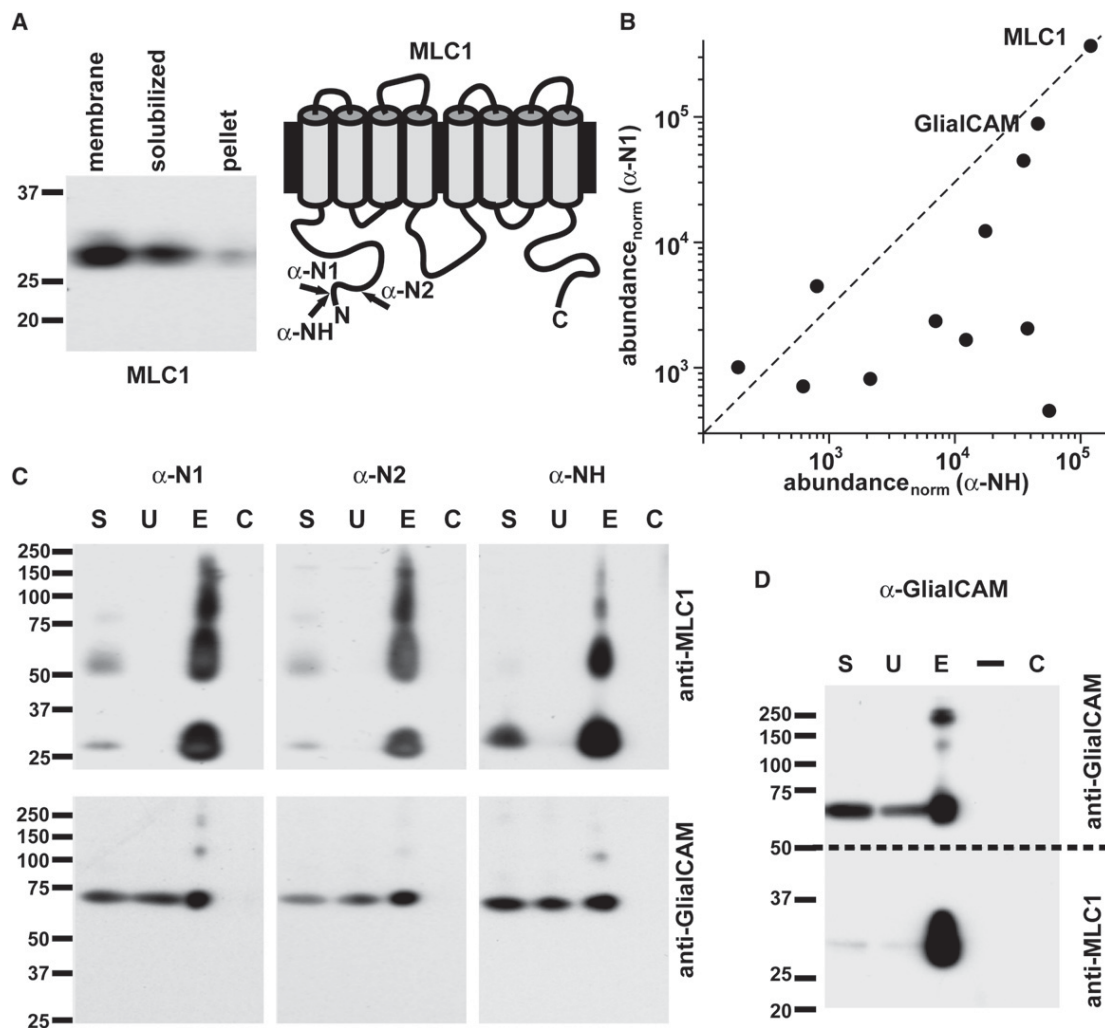


Figure 1. Proteomic Identification of GlialCAM as a Major Binding Partner of MLC1

(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 (α -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 α -N1 (from rat brain) versus AP with α -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 (α -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.^{5,7} 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°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°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 previously¹³ 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- μ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm² 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.¹⁷

Astrocytes were plated in 6-well plates at a density of 4×10^5 cells per well or in poly-D-lysine-coated coverslips at 7.5×10^4 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 μ M cytosine β -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.¹³ 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,¹⁸ 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 ^a
Two Mutations				
EL84/85	3	c.587C>A	p.Ser196Tyr	P ^b
	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	P + M
EL726	2	c.275G>A	p.Arg92Gln	P
	3	p.631G>A	p.Asp211Asn	M
EL774	2	c.292C>T (hom)	p.Arg98Cys	- ^c
EL785	1	c.68T>A	p.Leu23His	de novo
		c.461_462 del	p.Ser154TyrfsX16	P ^d
	4	c.742G>T	p.Gly248X	P ^d
EL816	3	c.442C>T (hom)	p.Pro148Ser	P+M
EL889/890	2	c.292C>T (hom)	p.Arg98Cys	P+M
One Mutation				
EL128	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	de novo
EL158	2	c.382G>A	p.Asp128Asn	P ^e
EL604	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	P
EL611	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	M
EL624/625	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	M
EL683/684	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	P
EL686	2	c.266G>A	p.Gly89Asp	P
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 ^d
	5	c.862C>T	p.Arg288Cys	P ^d
EL847	2	c.404_406 del	p.Lys135 del	P
EL862	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	M
EL882	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	de novo
EL903	2	c.265G>A	p.Gly89Ser	M ^e
EL944	2	c.274C>T	p.Arg92Trp	de novo

^a P, paternal; M, maternal; bold and italic indicates macrocephaly.

^b Probably from father but no DNA available.

^c No DNA of the parents available.

^d Both changes from same parental allele.

^e 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 MLC1¹³ 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,¹⁸ and neurons¹⁹ (Figure S3), whereas MLC1 has not been detected in oligodendrocytes.^{5-7,20} In MLC, vacuolation mainly affects the outer layers of myelin sheaths.² We investigated whether GlialCAM is localized in myelin. EM immunogold revealed

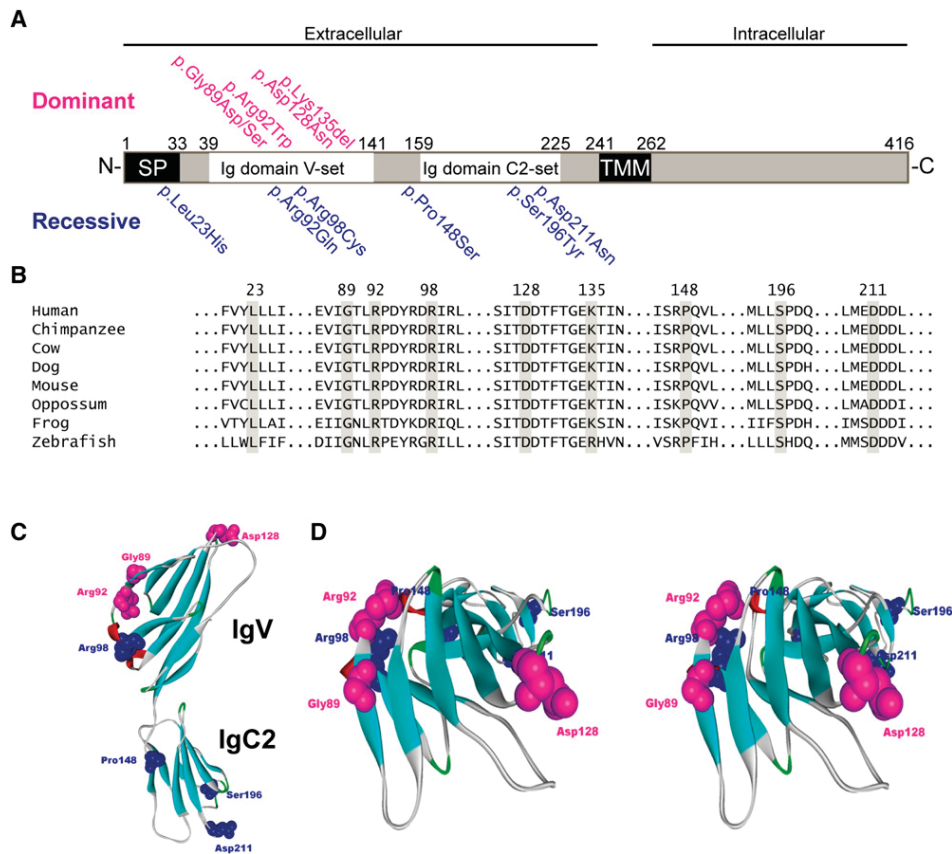


Figure 2. Genetic Studies in MLC Patients

(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*, ENSXETP000000008539.

(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 myelin¹⁴ 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

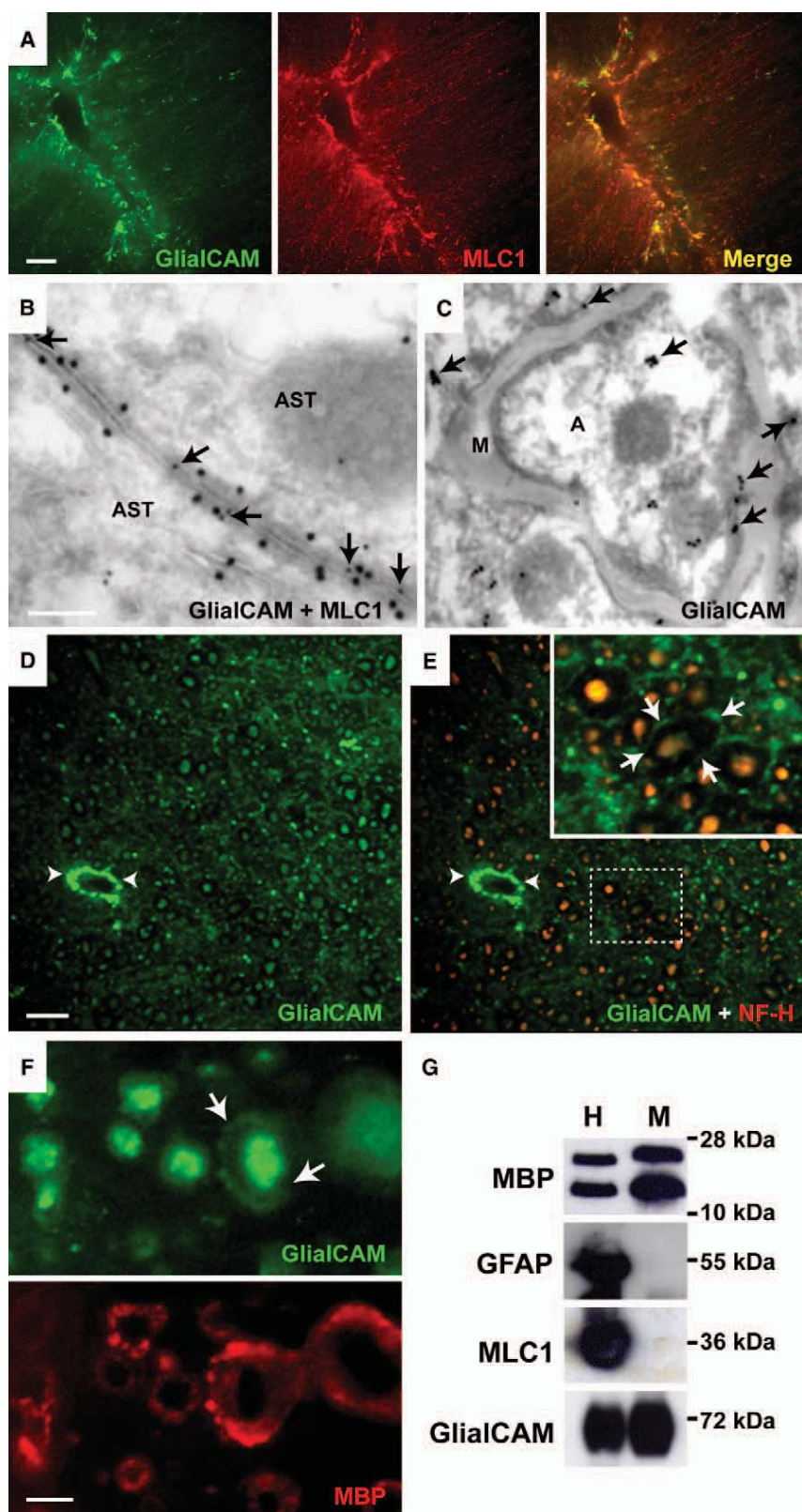


Figure 3. Colocalization of MLC1 and GlialCAM in Brain Tissue

(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 μ m (A and D), 500 nm (B and C), and 10 μ m (F).

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

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

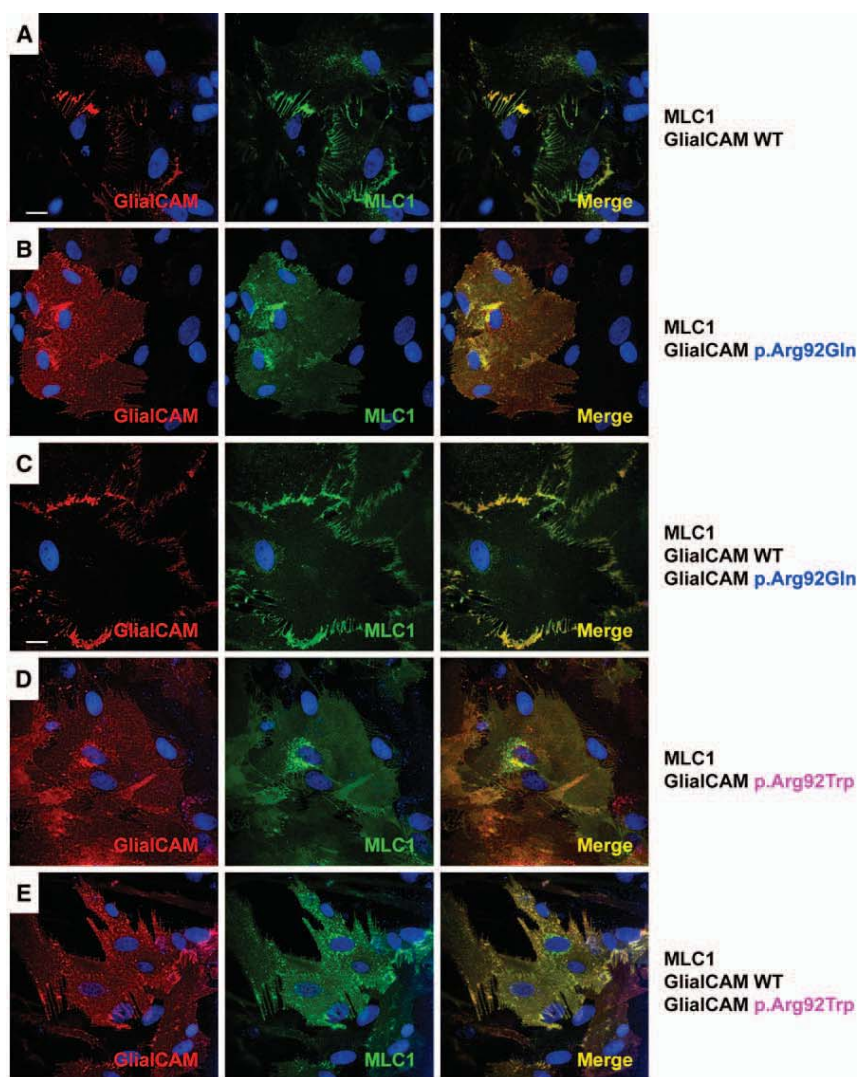


Figure 4. MLC1 and GlialCAM Subcellular Localization Changes Caused by Recessive and Dominant GlialCAM Mutations in Primary Cultures of Astrocytes

(A–F) Astrocytes were coinfectd with adenoviruses expressing MLC1 and wild-type GlialCAM (A) or GlialCAM containing a recessive (B, p.Arg92Gln) or a dominant (D, p.Arg92Trp) MLC-related mutation at MOI 3. In (C) and (E), cells were coinfectd 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 μ 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.¹ 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.^{9,10} We recently identified two presumably autosomal recessive, phenotypes among MLC patients without *MLC1* mutations,¹¹ 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

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.

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,²¹ it was subsequently found to be predominantly expressed in the central nervous system and was renamed GlialCAM.¹⁸ 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).^{22–27} 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.² *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.²⁸ 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.²⁹ 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-CO2-02 (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 Hersentichting (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

1. 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.
2. 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.
3. 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 (K1AA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 831–838.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrénia? *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* *125B*, 31–37.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Norton, W.T., and Poduslo, S.E. (1973). Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J. Neurochem.* *21*, 749–757.
15. Pandey, A., Andersen, J.S., and Mann, M. (2000). Use of mass spectrometry to study signaling pathways. *Sci. STKE* *2000*, pl1.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Lampe, A.K., and Bushby, K.M. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *J. Med. Genet.* *42*, 673–685.
26. 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.
27. 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.

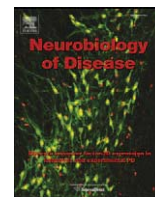
Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: A MLC disease cell model

Article publicat el juliol del 2011 a la revista *Neurobiology of Disease*.

Contribució:

Estudis fenotípics del model astrocitari *knock-down* de MLC1. (Figura 5).

Part dels estudis d'expressió de transportadors i canals relacionats amb la regulació del volum (Figura 7 A).



Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: A MLC disease cell model

Anna Duarri^{a,c}, Miguel Lopez de Heredia^{d,i,1}, Xavier Capdevila-Nortes^{a,1}, Margreet C. Ridder^e, Marisol Montolio^{a,c}, Tania López-Hernández^a, Ilja Boor^e, Chun-Fu Lien^f, Tracy Hagemann^g, Albee Messing^g, Dariusz C. Gorecki^f, Gert C. Scheper^e, Albert Martínez^h, Virginia Nunes^{b,d,i}, Marjo S. van der Knaap^e, Raúl Estévez^{a,c,*}

^a Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona, Spain

^b Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-750, Spain

^d Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U-730, ISCIII, Spain

^e Department of Pediatrics/Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

^f Institute of Biomedical and Biomolecular Sciences, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, UK

^g University of Wisconsin-Madison, WI, USA

^h Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Institute for Research in Biomedicine (IRB), Spain

ⁱ 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: restevez@ub.edu (R. Estévez).

¹ These authors contributed equally to this study.

Available online on ScienceDirect (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- μ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm² 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 $4 \cdot 10^5$ cells per well, or in poly-D-lysine-coated cover slips at $7.5 \cdot 10^4$ 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 β -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) (2 μ M) was added. Similarly, Fluo-uridine/uridine or dBAMPc were added at 20/50 μ g/ml or 250 μ 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 μ g/ml, Sigma) and Taxol (10 μ M, Sigma) was performed during 20 h (Sorci et al., 1998), while incubation with cytochalasin-D (10 μ 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- β -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- β -Tubulin (1:1000; Chemicon), anti-GFAP (1:2000; Chemicon), anti-HA (haemagglutinin) 3 F10 (1:500; Roche), anti- β -Dystroglycan (1:100; Novacastra), anti- α -Dystroglycan (1:30; Upstate), anti-Syntrophin (1:80; Affinity Bioreagents), and anti- β -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 μ 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 μ 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 μ l (corresponding to about 10 μ g of antibody):100 μ 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 μ 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- β -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°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°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'aaatgtactgctgctggagacgtttggc-cactgactgacgtctccacgcagtacatt3'; shRNA756 (against rat MLC1): 5'tgcacagcgcaataatccatgtttggccactgactgacatggattatgctgctgca3'; and shRNA905 (against rat MLC1): 5'ttcaggatcaattgcatccagttttggccactgactgactggatgattgacatcctgaa. 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°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°C for 10 min followed by 50°C for 60 min, using random hexamers as primers. cDNA was stored at -80°C . qPCR was performed with Lightcycler 480 probes master kit (Roche) following manufacturer instructions in a final volume of 10 μl , 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/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>) 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 (β -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 (Teijido 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 β -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 β -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)

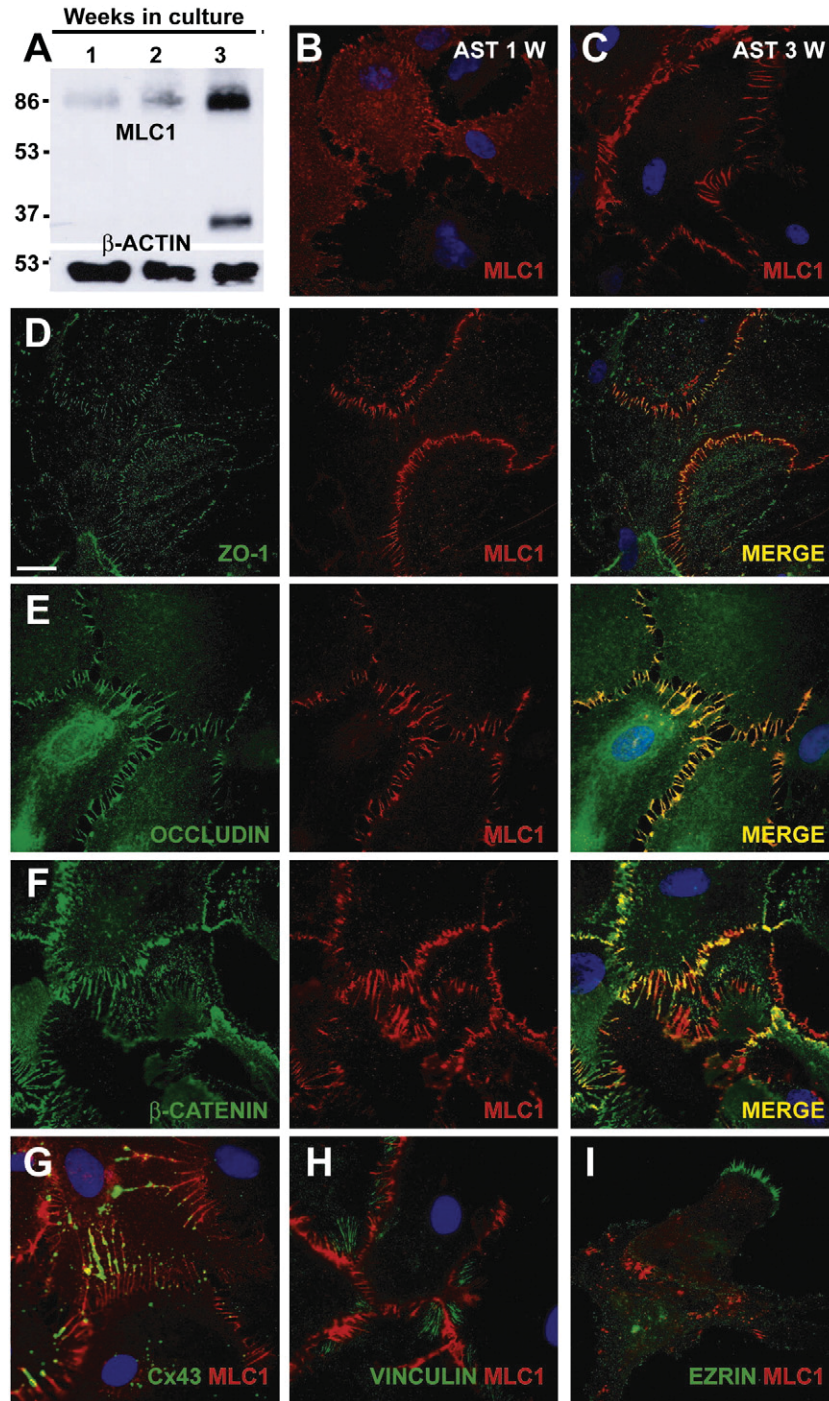


Fig. 1. Characterization of MLC1 expression in rat primary astrocyte cultures. (A) MLC1 expression analyzed by Western blot in extracts obtained from rat cortex primary astrocyte cultures arrested with AraC after 1, 2 or 3 weeks in culture. The expression of MLC1 increased with time in culture. MLC1 is detected mainly as a dimer and as a monomer. β -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 β -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 μ 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

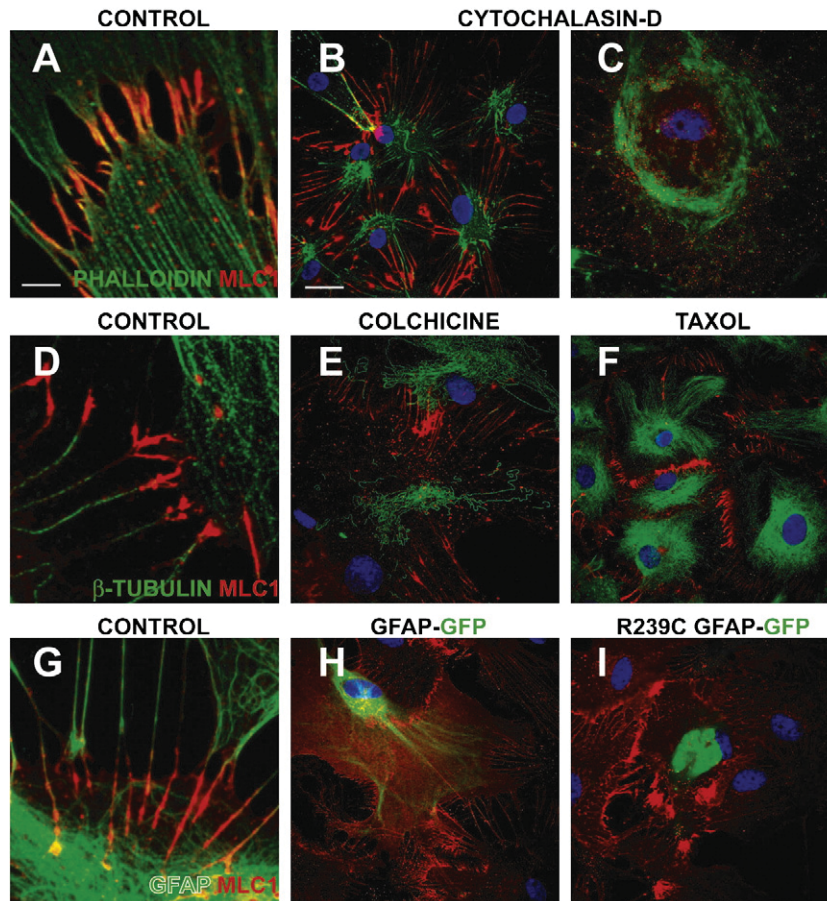


Fig. 2. Influence of the cytoskeleton on MLC1 localization in astrocytes. (A–C) *Actin cytoskeleton.* Rat primary quiescent astrocytes stained with MLC1 (red) and phalloidin (green), which stains actin filaments (A). Actin cytoskeleton depolymerization with Cytochalasin-D at 5 or 10 μ M for 2 h (B and C, respectively) caused alteration of cell morphology and, at the highest drug concentration, a complete delocalization of MLC1. (D–F) *Microtubule filaments.* β -tubulin (green), did not co-localize with MLC1 (D). Colchicine (tubulin inhibitor) treatment (10 μ g/ml) (E) for 20 h or (F) with 10 μ 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 μ m. Scale bar for all other figures: 20 μ 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, β -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 β -Dystroglycan were used (Fig. 3B). The DGC protein β -Dystroglycan was used as a marker of astrocyte–endothelial junctions. As already described (Haenggi and Fritschy, 2006), small gold particles corresponding to β -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 ($mdx^{\beta-geo}$), α -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

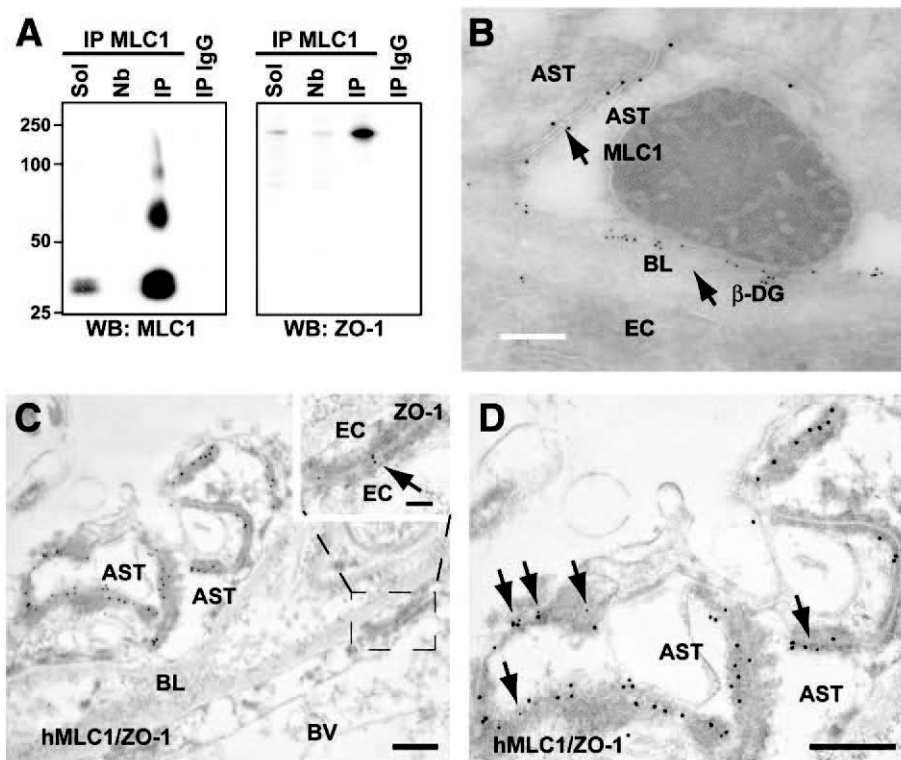


Fig. 3. Co-immunoprecipitation and colocalization of ZO-1 and MLC1 in astrocyte junctions. (A) Rat brain membranes were solubilized (Sol), and then immunoprecipitated using anti-MLC1 coupled beads. No MLC1 was detected in the not-bound (Nb) fraction or in the immunoprecipitate with an unrelated IgG (IP 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 β -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 β -DG, β -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).

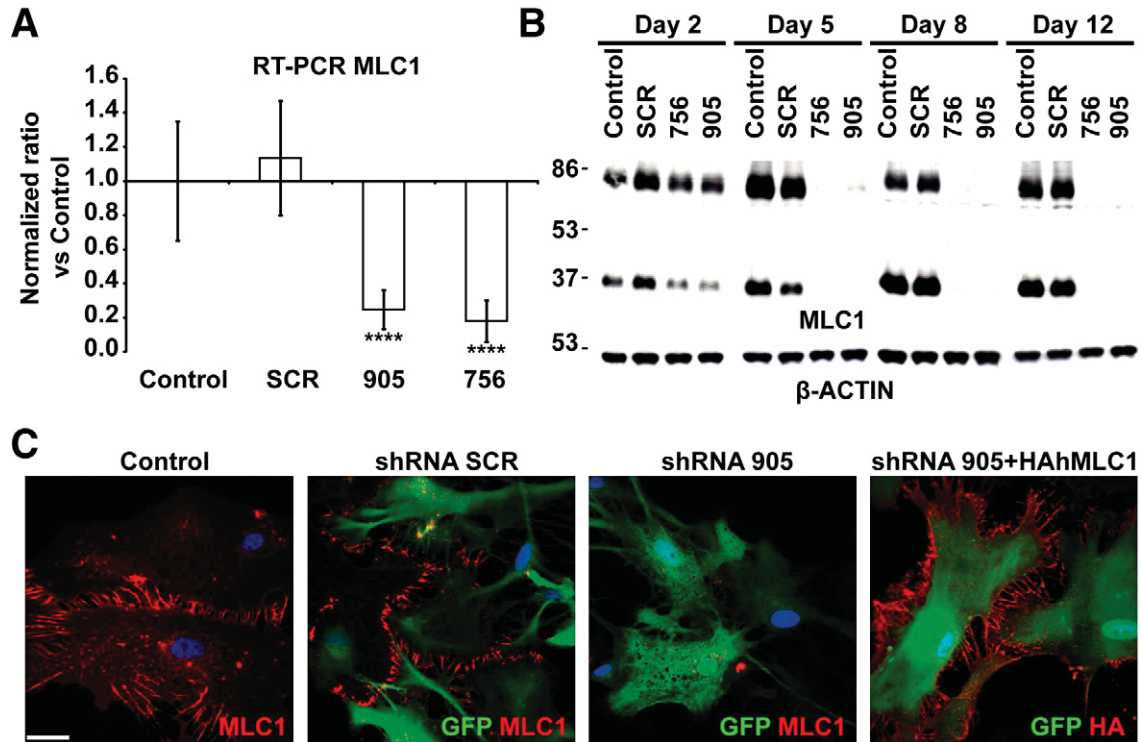


Fig. 4. Adenovector-mediated knockdown of MLC1 in rat primary astrocytes. (A) RT-qPCR experiment using specific primers to detect MLC1 mRNA. Data represent the mean \pm SEM of 4 different astrocyte preparations either control or treated with indicated shRNAs. Both shRNA 756 and 905 caused almost complete 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. β -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 μ m.

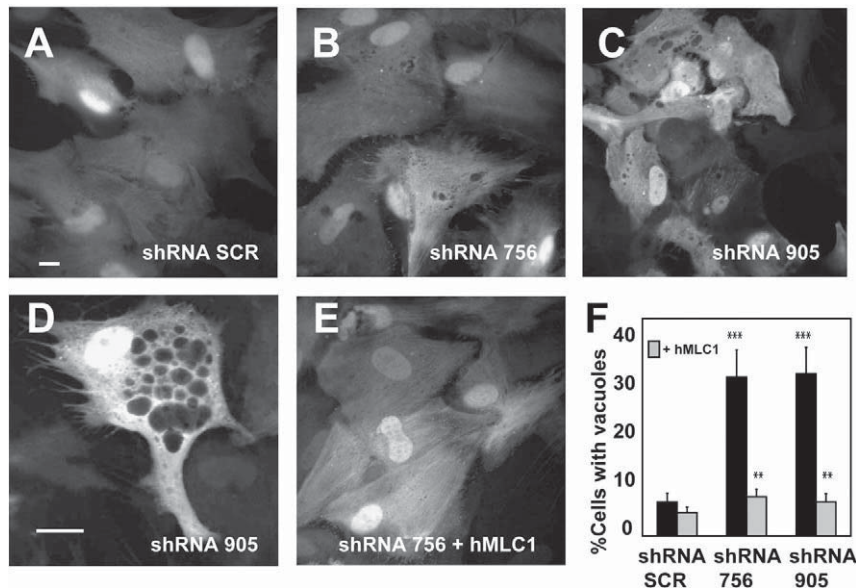


Fig. 5. Morphological alterations caused by changes in MLC1 expression. Primary culture of astrocytes were transduced with adenovectors expressing shRNA SCR (A), shRNA 756 (B) or shRNA 905 (C) at MOI 5. After 7 days cells were fixed, stained with DAPI and visualized in a CellR Imaging System. Pictures were taken using a 40 \times objective. Scale bar: 20 μ 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 μ 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, β -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 β -Catenin, Cx43, ZO-1 and Occludin (Supplementary Fig. 3).

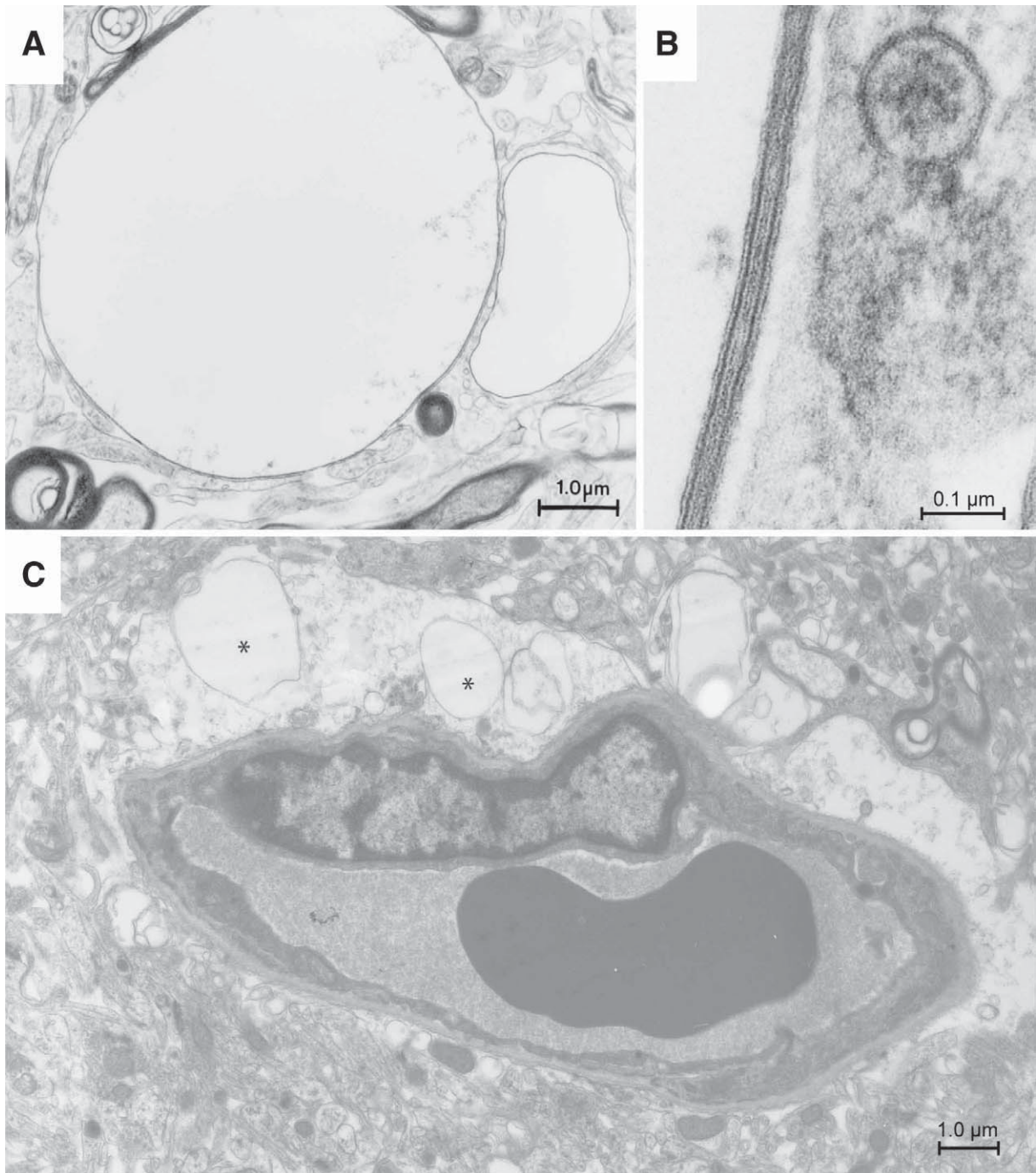


Fig. 6. Electron microscopy images of brain tissue from an MLC patient. (A) A membrane-covered vacuole is attached to a myelin sheath. (B) High magnification shows that the membrane displays the typical periodicity of myelin with the presence of major dense lines and intraperiod lines. (C) Astrocytic endfeet projecting toward a vessel also contain vacuoles (asterisks). Scale bars are shown in the lower right corner.

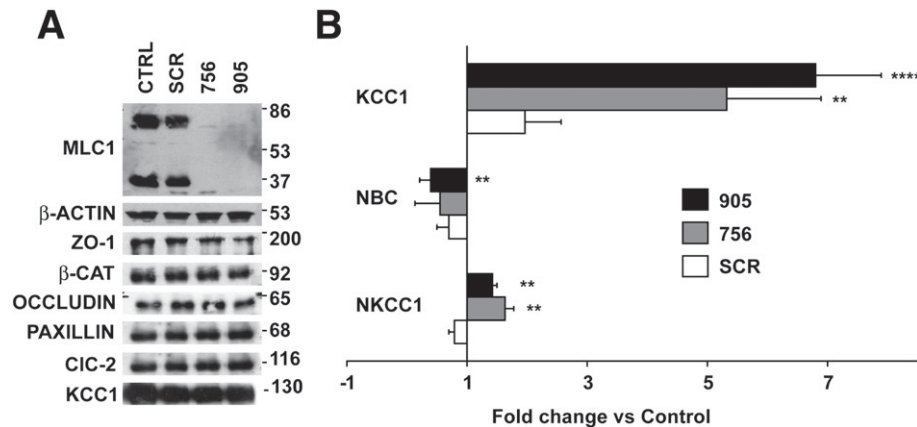


Fig. 7. Changes in expression of transporters and channels related with volume regulation. (A) 7 days after shRNA adenovector-mediated expression, cell extracts were analyzed in Western blots using antibodies against specific proteins. The result shown is representative of at least three independent 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 ± 1.57 fold for shRNA 756; 6.8 ± 1.1 fold for shRNA 905), a moderate increase for NKCC1 (1.63 ± 0.15 fold for shRNA 756; 1.42 ± 0.07 fold for shRNA 905) and a moderate decrease for NBC (0.55 ± 0.40 fold for shRNA 756; 0.39 ± 0.15 fold for shRNA 905). Notably, transduction with SCR shRNA also induced KCC1 expression when compared with control astrocytes (1.96 ± 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 (β -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.
- Haeggli, 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.
- 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 (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)-MsiY3 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-C1 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.

Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts

Article publicat l'agost del 2011 a la revista Human Molecular Genetics.

Contribució:

Estudis d'expressió i localització de GlialCAM en cultius d'astròcits mancats de MLC1 (Figura 4).

Construcció de les mutacions de GlialCAM.

Desenvolupament del mètode Split-TEV i construcció de les proteïnes pels estudis d'interacció (Figura 5 A i 6).

Molecular mechanisms of *MLC1* and *GLIALCAM* mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts

Tania López-Hernández^{1,†}, Sònia Sirisi^{1,5,†}, Xavier Capdevila-Nortes¹, Marisol Montolio^{1,6}, Victor Fernández-Dueñas³, Gert C. Scheper⁸, Marjo S. van der Knaap⁸, Pilar Casquero⁹, Francisco Ciruela³, Isidre Ferrer^{4,10}, Virginia Nunes^{2,5,7} and Raúl Estévez^{1,6,*}

¹Sección de Fisiología, ²Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, ³Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina and ⁴Institut Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, Idibell-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL, Centro de Investigación en Red de Enfermedades rara (CIBERER), Barcelona, Spain, ⁶U-750 and ⁷U-730: ISCIII, Valencia, Spain, ⁸Department of Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, ⁹Sección de Neurología, Hospital Mateu Orfila, Maó, Menorca, Spain and ¹⁰CIBERNED (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.

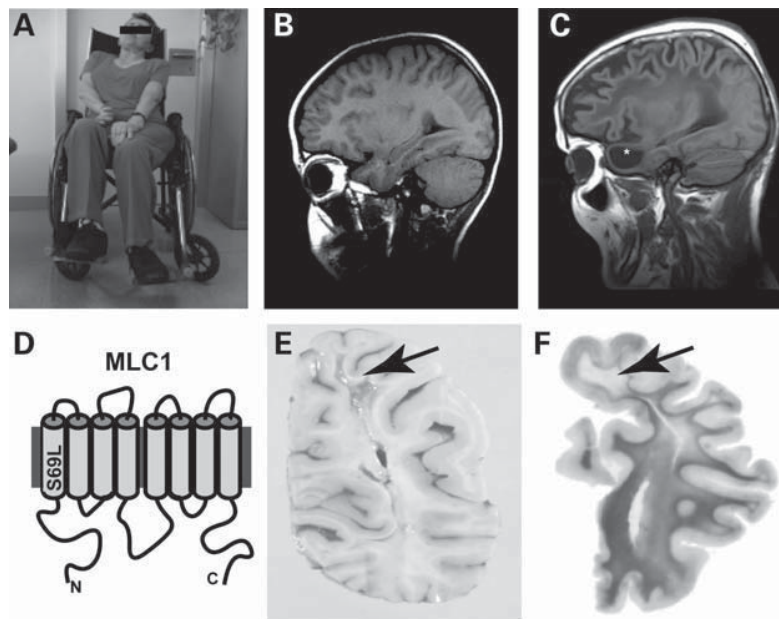


Figure 1. Characterization of an MLC patient. (A) Picture of the MLC-affected patient studied, which showed macrocephaly, motor clumsiness and ataxia. (B and C) Sagittal T1-weighted images of a control subject (B) and of the patient (C) showing subcortical cysts on frontal and temporal regions (asterisk) (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

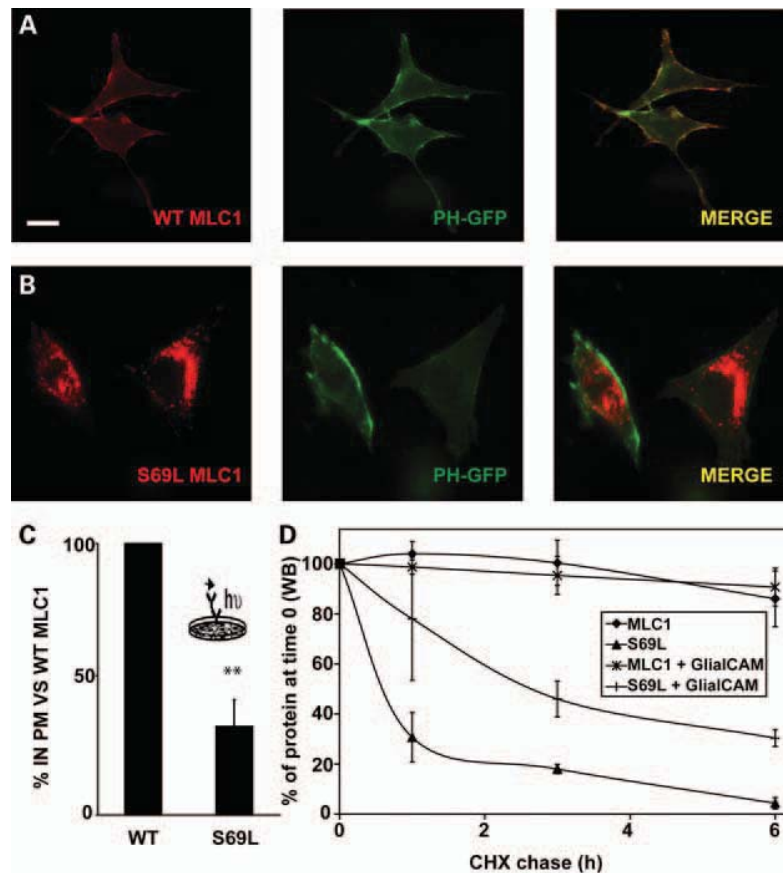


Figure 2. *In vitro* studies of the defective protein S69L MLC1 with or without GlialCAM. (A and B) HeLa cells were co-transfected with PH-GFP, as a marker of plasma membrane, together with wild-type MLC1 (A) or the S69L-defective protein (B) containing two HA epitope tags. Two days after the transfection, 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 μ 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 μ 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 α 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 δ 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

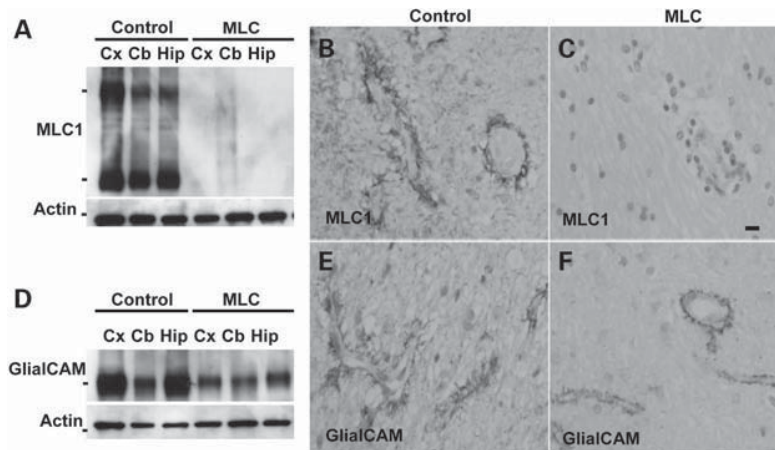


Figure 3. MLC1 and GlialCAM expression in brain tissue. (A) MLC1 expression is detected in solubilized extracts from the control brain, but it is nearly undetectable in extracts from the MLC patient. Actin was used as a loading control. Cx, cortex; Cb, cerebellum; Hip, hippocampus. The positions of the 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 μm .

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)

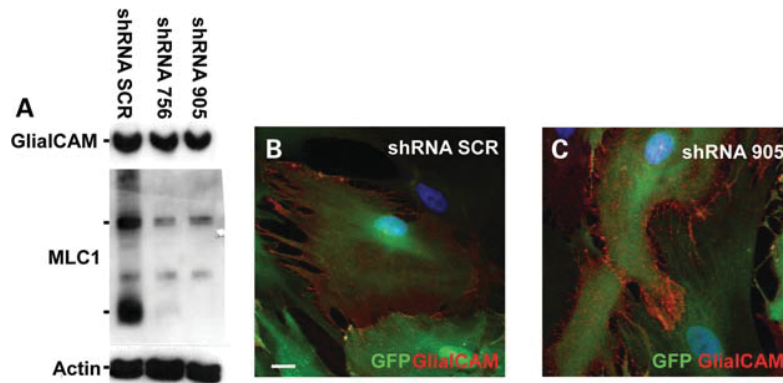


Figure 4. Expression and localization of GlialCAM in primary astrocytes depleted of MLC1 by RNA interference. (A) Seven days after shRNA (SCR: Scrambled or 756 and 905: against MLC1) adenovector-mediated expression, cell extracts were analyzed in western blot studies using antibodies against GlialCAM 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 μ 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 FAsH epitope and cyan fluorescent protein (CFP), respectively (MLC1^{FAsH} and GlialCAM^{CFP}). The GlialCAM^{CFP}/MLC1^{FAsH} hetero-oligomer formation caused FRET between the fluorescent proteins (Fig. 5B, left panel). Significant FRET was not observed in cells expressing only glialCAM^{CFP} or co-expressing glialCAM^{CFP} 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

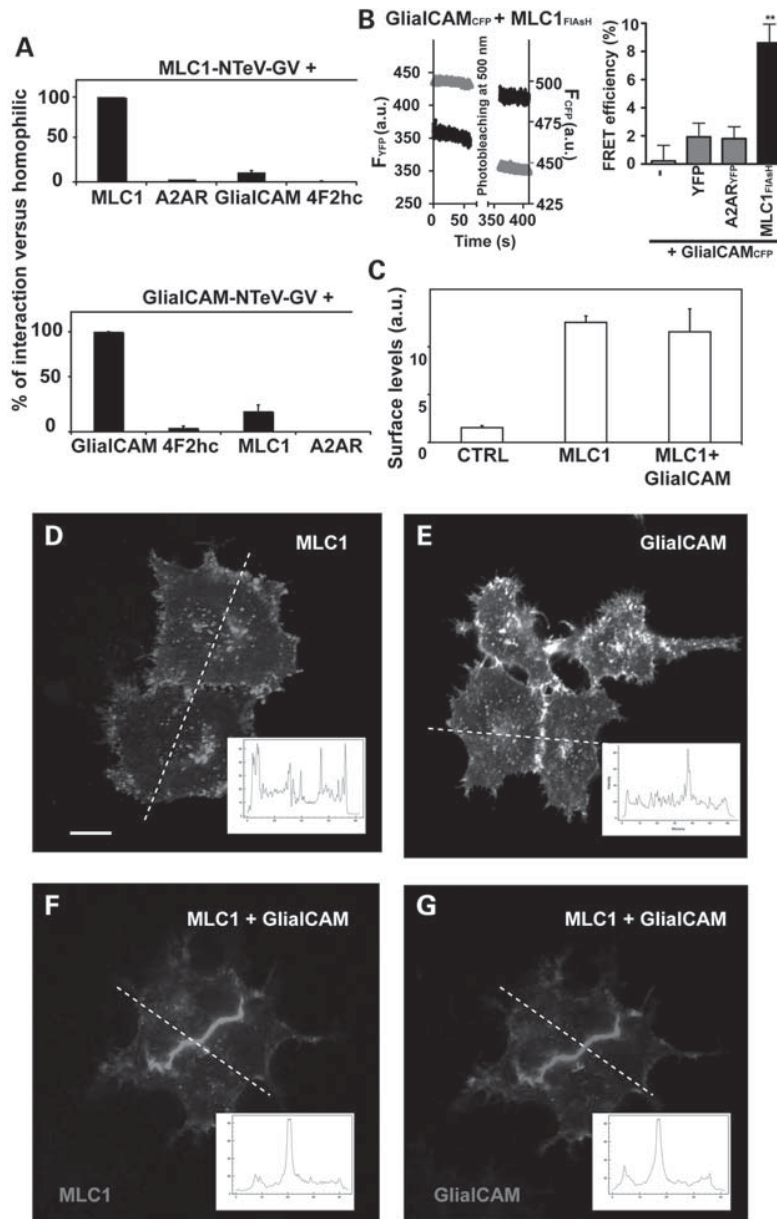


Figure 5. *In vitro* characterization of the interaction between MLC1 and GlialCAM. (A) HeLa cells were co-transfected with the indicated constructs, and interaction was monitored by split-TEV assays as described in Materials and Methods. The signal that was obtained for homo-oligomerization of MLC1 (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^{FlAsH} and GlialCAM^{CFP} 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^{CFP} ($n = 6$), GlialCAM^{CFP} and YFP ($n = 6$), GlialCAM^{CFP} and A_{2A}R^{YFP} ($n = 6$), and GlialCAM^{CFP} and MLC1^{FlAsH} ($n = 10$); 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 μ 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 ± 0.06 ($n = 45$), and MLC1 in the presence of GlialCAM had a value of 3.95 ± 0.06 ($n = 42$). On the other hand, GlialCAM alone had a value of 2.43 ± 0.15 ($n = 44$), and GlialCAM in the presence of MLC1 had a value of 3.99 ± 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

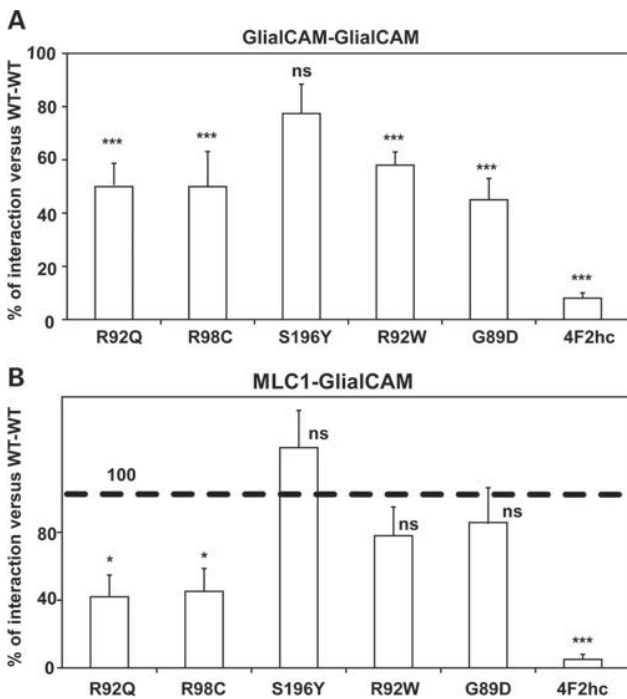


Figure 6. MLC-causing *GLIALCAM* mutations affect the interaction mainly between GlialCAM molecules. HeLa cells were co-transfected with the indicated constructs, and interaction was monitored by split-TEV assays as described in Materials and Methods. The signal that was obtained for homo-oligomerization 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

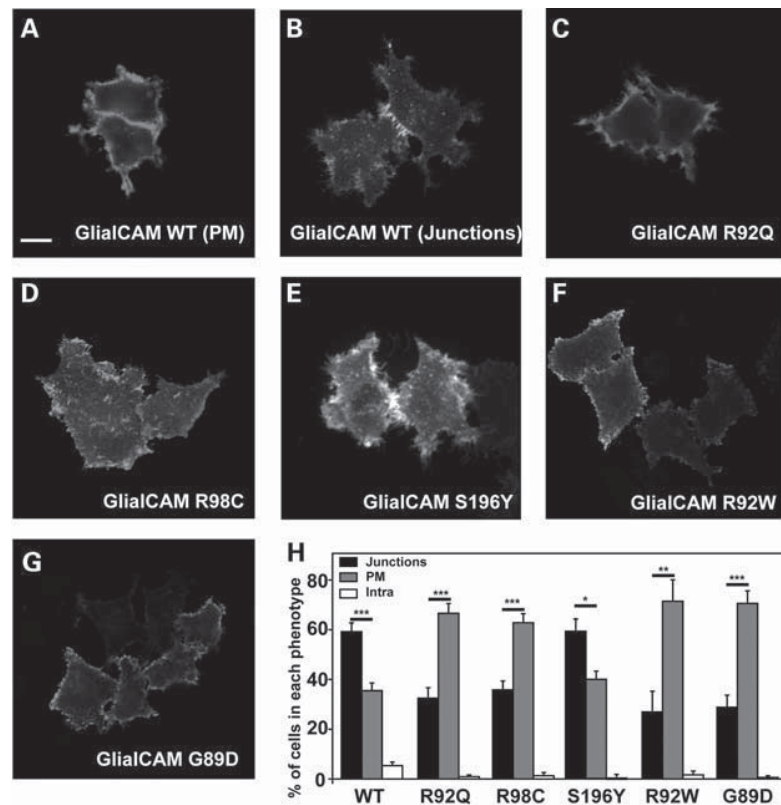


Figure 7. Trafficking defect of GlialCAM-defective proteins expressed in HeLa cells. HeLa cells were transfected with plasmids expressing flag-tagged wild-type GlialCAM (A and B) or containing recessive [R92Q (C), R98C (D), S196Y (E)] or dominant [R92W (F), G89D (G)] MLC-causing mutations. Cells were fixed and permeabilized and then immunofluorescence was performed using flag monoclonal antibodies detecting GlialCAM protein. Scale bar: 20 μ 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°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°C . Antibodies to glial fibrillary acidic protein (Dako, Barcelona, Spain), β -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- α -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- α 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 H_2O_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.

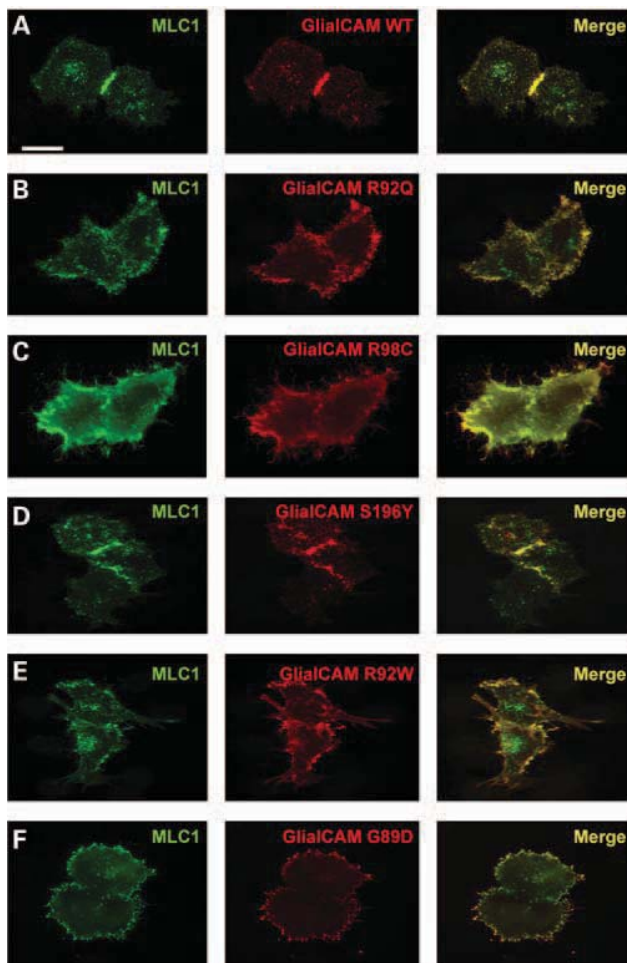


Figure 8. MLC1 follows GlialCAM localization in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with plasmids expressing wild-type MLC1 and flag-tagged wild-type GlialCAM (A) or containing recessive [R92Q (B), R98C (C), S196Y (D)] or dominant [R92W (E), G89D (F)] MLC1-causing mutations. Cells were 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 μm .

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 tetracycline 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 (tetracycline 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°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 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 100 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 $3\% \text{ paraformaldehyde}$. After PBS washing, cells were then blocked with $1\% \text{ BSA}$ in PBS for 30 min, and incubated with 1 ml of 3F10 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 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 *Gussia 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 μ g, with the following ratios: 0.75 μ g of each protein containing the TEV-N and the TEV-C fragments, 0.3 μ g of the reporter vector pNEBr-X1GLuc and 0.2 μ g of the pCMV- β Gal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 h, 20 μ 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 μ M native colenterazine. To normalize the data, cells were solubilized and 30 μ l of the cell lysates were used to measure the β -galactosidase enzyme activity, using the Luminiscent β -Galactosidase Detection Kit II (Clontech) in the same luminometer.

FIAsh labeling

FIAsh 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 Na₂HPO₄, 5 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 0.5 MgCl₂, 0.4 Mg₂SO₄, 1.26 CaCl₂, 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 FIAsh/EDT₂. FIAsh 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 μ 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 FIAsh 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. FIAsh) (35). FIAsh-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 (FIAsh) and 480 \pm 20 nm (CFP_{pre}) 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 FIAsh at 500 nm for 5 min. Finally, the emission intensities of FIAsh and CFP (CFP_{post}) 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 μ 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 μ 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- β -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.
- Patrino, 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., Tejjido, 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 y⁺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., Lluis, 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., Sattonnet-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., Gaitta, 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. Vilaradaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z. and Lohse, M.J. (2008) Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 126–131.

Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation

Article publicat el novembre del 2011 a la revista Brain.

Contribució:

Amplificació i purificació dels adenovirus utilitzats per generar els models astrocitaris en els estudis de RVD.

Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation

Margreet C. Ridder,^{1,*} Ilja Boor,^{1,*} Johannes C. Lodder,² Nienke L. Postma,¹ Xavier Capdevila-Nortes,³ Anna Duarri,³ Arjen B. Brussaard,² Raúl Estévez,³ Gert C. Scheper,¹ Huibert D. Mansvelder^{2,†} and Marjo S. van der Knaap^{1,†}

1 Department of Child Neurology, VU University Medical Centre, 1081HV Amsterdam, The Netherlands

2 Department of Integrative Neurophysiology, Centre for Neurogenomics and Cognitive Research, VU University, 1081HV Amsterdam, The Netherlands

3 Department of Physiological Sciences II, Faculty of Medicine, University of Barcelona, and CIBER de enfermedades raras, 4U-750, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

*These authors contributed equally to this work.

†These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: M.S. van der Knaap,
Department of Child Neurology,
VU University Medical Center,
De Boelelaan 1117,
1081 HV Amsterdam,
The Netherlands
E-mail: ms.vanderknaap@vumc.nl

Megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts is a genetic brain disorder with onset in early childhood. Affected infants develop macrocephaly within the first year of life, after several years followed by slowly progressive, incapacitating cerebellar ataxia and spasticity. From early on, magnetic resonance imaging shows diffuse signal abnormality and swelling of the cerebral white matter, with evidence of highly increased white matter water content. In most patients, the disease is caused by mutations in the gene *MLC1*, which encodes a plasma membrane protein almost exclusively expressed in brain and at lower levels in leucocytes. Within the brain, *MLC1* is mainly located in astrocyte–astrocyte junctions adjacent to the blood–brain and cerebrospinal fluid–brain barriers. Thus far, the function of *MLC1* has remained unknown. We tested the hypothesis that *MLC1* mutations cause a defect in ion currents involved in water and ion homeostasis, resulting in cerebral white matter oedema. Using whole-cell patch clamp studies we demonstrated an association between *MLC1* expression and anion channel activity in different cell types, most importantly astrocytes. The currents were absent in chloride-free medium and in cells with disease-causing *MLC1* mutations. *MLC1*-dependent currents were greatly enhanced by hypotonic pretreatment causing cell swelling, while ion channel blockers, including Tamoxifen, abolished the currents. Down regulation of endogenous *MLC1* expression in astrocytes by small interfering RNA greatly reduced the activity of this channel, which was rescued by overexpression of normal *MLC1*. The current–voltage relationship and the pharmacological profiles of the currents indicated that the channel activated by *MLC1* expression is a volume-regulated anion channel. Such channels are involved in regulatory volume decrease. We showed that regulatory volume decrease was hampered in lymphoblasts from patients with megalencephalic leucoencephalopathy. A similar trend was observed in astrocytes with decreased *MLC1* expression; this effect was rescued by overexpression of normal *MLC1*. In the present study, we show that absence or mutations of the *MLC1* protein negatively

Received June 8, 2011. Revised July 13, 2011. Accepted August 3, 2011. Advance Access publication October 17, 2011

© The Author (2011). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

impact both volume-regulated anion channel activity and regulatory volume decrease, indicating that megalencephalic leucoencephalopathy is caused by a disturbance of cell volume regulation mediated by chloride transport.

Keywords: leucodystrophy; MLC1; astrocytes; chloride currents; volume-regulated anion channel

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney cells; $I-V$ = current–voltage; MLC = megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts; Sf9 = *Spodoptera frugiperda* 9; VRAC = volume-regulated anion channel

Introduction

Megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts (MLC; MIM 604004) is an autosomal recessive brain disorder with infantile onset, first described in 1995 (van der Knaap *et al.*, 1995). Patients with MLC develop macrocephaly during the first year of life. After several years, slowly progressive cerebellar ataxia and spasticity occur. Most patients become wheelchair-dependent in their teens. Brain MRI reveals diffuse signal abnormalities and swelling of the cerebral white matter and subcortical cysts (Supplementary Fig. 1; van der Knaap *et al.*, 1995). Quantitative MRI parameters indicate that the white matter water content is highly increased (van der Voorn *et al.*, 2006).

In 2001, a gene for MLC, *MLC1*, was identified (Leegwater *et al.*, 2001). This gene encodes a 377 amino acid plasma membrane protein with eight transmembrane domains, almost exclusively expressed in the brain and leucocytes (Boor *et al.*, 2005). Within the brain the *MLC1* protein is mainly expressed in astrocyte–astrocyte junctions adjacent to the blood–brain and CSF–brain barriers (Teijido *et al.*, 2004; Boor *et al.*, 2005; Duarri *et al.*, 2011). *MLC1* mutations all disrupt the membrane localization of the *MLC1* protein (Duarri *et al.*, 2008). We have recently shown that mutations in *GLIALCAM*, coding for hepatic and glial cell adhesion molecule GlialCAM, also cause MLC. *GLIALCAM* mutations also disrupt the localization of *MLC1* (Lopez-Hernandez *et al.*, 2011), indicating that *MLC1* is central in the pathophysiology of MLC.

Thus far, the function of *MLC1* has remained unknown. Amino acid sequence analysis reveals a weak similarity with potassium channel Kv1.1, ABC-2 type transporters and sodium:galactoside symporters (Leegwater *et al.*, 2001; Teijido *et al.*, 2004; Boor *et al.*, 2005). Further, *MLC1* contains an internal repeat that is found in several ion channel proteins (Teijido *et al.*, 2004). These observations and the highly increased white matter water content prompted us to test the hypothesis that *MLC1* plays a role in ion transport involved in cell volume regulation.

Materials and methods

The study was performed with approval of the Institutional Review Board. Written informed consent was obtained for the use of patient lymphoblasts. The *MLC1* mutations of the patients, of whom lymphoblasts or MRIs were used, are given in Table 1.

Cell culture

Culture media for human embryonic kidney (HEK293) and HeLa cells consisted of DMEM/HAM-F10 (1:1) (Invitrogen) supplemented with

10% foetal calf serum (Invitrogen). *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells were cultured in suspension in serum-free HyQ SFX-Insect medium (Perbio) at 27°C. Isolation and immortalization of human lymphoblasts were performed as previously described (van Kollenburg *et al.*, 2006). Lymphoblasts were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen), supplemented with 10% foetal calf serum. Primary rat astrocytes were isolated and cultured as described (van Kollenburg *et al.*, 2006) with the exception that we used trypsin and trituration with a glass Pasteur pipette to dissociate the cells instead of passing through needles.

For influence of culture conditions on *MLC1* expression, see Supplementary Fig. 2.

Transfection and infection

HEK293 and HeLa cells were transfected using calcium phosphate precipitation and lipofectamine (Invitrogen), respectively, with a construct expressing green fluorescent protein (pEGFPN1, Clontech) to mark transfection either alone or in combination with constructs expressing wild-type or mutant *MLC1* (*MLC1_Ser93Leu* or *MLC1_Cys326Arg*). HEK293 and HeLa cells were used for patch clamp experiments 24–48 h after transfection.

Constructs for expression in Sf9 insect cells were made by cloning the sequences for green fluorescent protein (to mark transfection) or *MLC1* (wild-type or mutant) into pEX5 (Novagen). Sf9 cells were transfected with Insect GeneJuice (VWR). Sf9 cells were used 48–72 h after transfection.

Astrocytes were infected with adenoviruses (multiplicity of infection [= ratio of infectious virus particles to cells] of 4–6) and used after 6–8 days for patch clamp experiments. Generation of adenoviruses for expression of wild-type or mutant (Ser246Arg) haemagglutinin-tagged *MLC1* has been described (Duarri *et al.*, 2008).

Small interfering RNAs

The generation of adenoviruses for expression of small interfering RNA against nucleotides 405–425 of the coding region of rat *MLC1* or a sequence without messenger RNA target as control has been described (Duarri *et al.*, 2011). Sequences are given in Supplementary Table 1.

Table 1 *MLC1* mutations

Patient	Mutations	Patient material used
Patient 1	c.135_136insC, p.Cys46LeufsX34 (homozygous)	Lymphoblasts, MRI
Patient 2	c.736A>C, p.Ser246Arg (homozygous)	Lymphoblasts

MLC1 expression

Total RNA was isolated using RNA-Bee (BioConnect). Complementary DNA was made with 5 µg total RNA with SuperScriptTMIII (Invitrogen) according to the vendor's instruction. Expression of MLC1 messenger RNA was studied by reverse transcription PCR as described (Boor *et al.*, 2006), or quantitative PCR using SYBR[®] Green according to the vendor's protocol (Applied Biosystems). For primers see Supplementary Table 1. The values obtained were corrected for the amount of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase messenger RNA in each sample (ΔC_d). In addition, the relative expression of MLC1 messenger RNA in the separate cell types as compared with its expression in the brain sample was calculated.

Immunocytochemistry

For immunofluorescence staining, cells were fixed with phosphate-buffered saline containing 4% paraformaldehyde for 5 min, permeabilized with 1% goat serum, 0.9% NaCl and 0.1% saponin in phosphate-buffered saline for 10 min at room temperature and blocked with 5% goat serum, 0.9% NaCl and 0.05% saponin in phosphate-buffered saline for 30–60 min. Primary antibodies were diluted in 1% goat serum, 0.9% NaCl and 0.01% saponin in phosphate-buffered saline and cells were incubated overnight at 4°C. Rabbit anti-mouse MLC1 (1:100) (Teijido *et al.*, 2004), rabbit anti-human MLC1 (1:100) (Teijido *et al.*, 2004; Duarri *et al.*, 2008), chicken anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000; Chemicon), mouse anti-haemagglutinin clone HA-7 (1:1000; Sigma) and appropriate secondary antibodies were used. Cells were washed and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies: Alexa-488 goat anti-chicken, Alexa-568 goat anti-rabbit, Alexa-594 goat anti-mouse. Coverslips were mounted in Vectashield[®] medium (Vector Laboratories) with 1.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) and visualized using a Leica DM6000B microscope.

Electrophysiology

Voltage clamp experiments were performed at 20–22°C using the tight-seal, whole-cell variant of the patch clamp technique as described previously (Hamill *et al.*, 1981) and currents were amplified using an AXOPATCH-200A amplifier (Axon Instruments). In all experiments, unless mentioned specifically, we used iso-osmotic chloride-selective bath and pipette solutions.

In experiments with HeLa cells, HEK293 cells, lymphoblasts and astrocytes, the iso-osmotic bath solution contained in mM: 140 *N*-methyl-D-glucamine-Cl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], 0.1 LaCl₃ (average osmolarity 295 mOsmol/l, pH 7.4), and the pipette (resistance of 3–7 MΩ) solution contained in mM: 40 *N*-methyl-D-glucamine-Cl, 100 *N*-methyl-D-glucamine-gluconate, 2 MgCl₂, 10 HEPES and Ca²⁺-ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) buffer (buffered to pH 7.2, average osmolarity 290 mOsmol/l), unless mentioned otherwise.

In Sf9 cells, the iso-osmotic bath solution contained in mM: 180 *N*-methyl-D-glucamine-Cl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 MES [2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid] (average osmolarity 365 mOsmol/l, pH 6.2) and the pipette (resistance of 3–6 MΩ) solution contained in mM: 50 *N*-methyl-D-glucamine-Cl, 120 *N*-methyl-D-glucamine-gluconate, 2 MgCl₂, 10 *N*-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES). The extracellular pH and osmolarity mimics that of the HyQ SFX-Insect medium (Larsen *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 1999).

Hypo-osmotic pretreatments were executed as previously described (Lascola and Kraig, 1996). The hypo-osmotic solution had a 40% reduced osmolarity as compared with the iso-osmotic solution.

Adenovirus-infected astrocytes were treated with 0.025% trypsin for 5 min before recording.

Where indicated, 10 µM Tamoxifen (Tocris Bioscience), 1 mM zinc (Sigma), 100 µM NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid; Sigma) or 200 µM DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid disodium salt hydrate; Sigma) was added to the bath solution. For the inhibition of chloride channels in astrocytes, Tamoxifen had to be used in reduced concentration (1 µM instead of 10 µM) and had to be present during both trypsin pretreatment and electrophysiological recording, as described before (Zhang *et al.*, 1994). The other blockers were added to the bath solution after the trypsin treatment. In all lymphoblast experiments, 2 mM ATP (as Mg²⁺ salt) was present in the pipette-filling solution.

The electrophysiology protocols are summarized in Fig. 1. The holding potential was –60 mV. Currents were measured with voltage ramps of –120 to +120 mV, or –100 to +100 mV for Sf9 cells and astrocytes in steps of 0.14 mV/ms. Sample interval was 250 µs. Data were filtered at 2 kHz. Each current measurement was an average obtained from five ramps, with an interval of 1 s between the ramps. Voltage ramps were used for all current–voltage curves and bar figures (Figs 2–5). In addition to the voltage ramps, we also recorded current traces obtained from a step voltage protocol (holding potential –60 mV, 250 ms steps ranging from –120 to +60 mV, spaced 10 mV). For Sf9 cells and astrocytes we used a step voltage protocol ranging from –100 to +100 mV. Supplementary Figs 4 and 5B are the only figures incorporating currents from the step voltage experiments. A tight seal (resistance >1 ΩG) was established prior to the whole-cell patch clamp recordings. Only cells that showed a stable holding current and a low series resistance (<6 MΩ) throughout the experiment were analysed. Mean capacitance of the different cell types are given in Table 2. Voltage clamp protocol, data acquisition, storage and analysis were carried out using commercial software (pClamp 9.1, Axon Instruments).

Potassium currents were measured, as previously described (Benfenati *et al.*, 2007), using bath solution containing (in mM) 140 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES and 5 glucose; pH was adjusted to 7.4 with NaOH and osmolarity was adjusted to ~315 mOsmol/l with mannitol. The intracellular (pipette) solution contained (in mM) 144 KCl, 2 MgCl₂, 5 EGTA and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.2 with KOH and osmolarity was adjusted to ~300 mOsmol/l with mannitol (Benfenati *et al.*, 2007).

Imaging of regulatory volume decrease

Astrocytes and lymphoblasts were loaded with 5 µM Calcein-AM (Molecular Probes) for 20 min at 37°C (Crowe *et al.*, 1995). Changes in cell volume of single lymphoblasts, plated on poly-ornithine-coated glass cover slips, were monitored by measuring cell surface area. Changes in cell volume of single astrocytes, plated on glass cover slips, were analysed by measuring calcein fluorescence using the calcein-quenching method (Solenov *et al.*, 2004). Chloride selective iso- and hypo-osmotic (–40%) solutions were used, as described in the electrophysiology section. To ensure that differences between cells were dependent on anion permeability rather than cation permeability, lymphoblasts were pretreated with 40 µg/ml and astrocytes with 10 µg/ml gramicidin (Sigma) for 5 min prior to the start of the experiment. Cells were bathed in the iso-osmotic solution (20–22°C) and transferred to a continuously perfused (5 ml/min) recording chamber, equipped with a microscope with a ×10 objective. An image was taken every 30 s. At the beginning of each experiment, images were obtained for

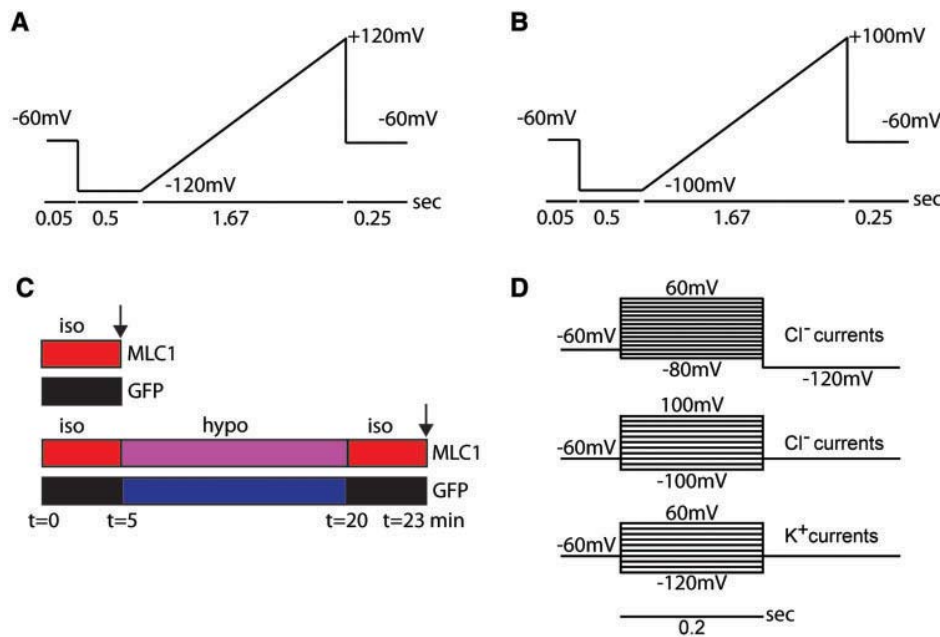


Figure 1 Electrophysiology protocols. (A) Schematic representation of the voltage ramp protocol used for HEK293 cells, HeLa cells and lymphoblasts. (B) Schematic representation of the voltage ramp protocol used for Sf9 cells and rat primary astrocytes. (C) Schematic representation of the method used for hypotonic pretreatment of cells. The two upper bars represent the standard procedure without hypo-shock, where cells are kept in iso-osmotic bath solution for at least 5 min before recording. The lower bars show experimental set-up for incubation in hypo-osmotic bath solutions before recording in standard bath solution. The colours indicate the cells used [transfected with wild-type MLC1: red and purple; transfected with a control green fluorescent protein (GFP) construct: black and blue]. The osmotic conditions of the bath solutions are indicated by red or black for iso-osmotic, and purple or blue for hypo-osmotic conditions. The arrows indicate the starting point of the measurements. (D) Schematic representation of the step protocols used for measuring chloride currents in HEK293 cells (*upper part*) and astrocytes (*middle part*) and potassium currents in astrocytes (*lower part*).

5 min in the iso-osmotic solution to establish the baseline. Cells were perfused with the hypo-osmotic solution for 30 min, after which the iso-osmotic solution was reintroduced and images were taken for another 10 min. The cell surface or average fluorescence of each cell in the acquired images was calculated using ImageJ software (National Institutes of Health). Changes in cell surface and average fluorescence were expressed as S_t/S_0 and F_t/F_0 ratios, respectively, where S_0 and F_0 are the average cell surface area and fluorescence under iso-osmotic conditions at the beginning of the experiment. The curve from maximum swelling to the end of the hypo-osmotic treatment was fitted with an exponential curve using Microsoft Excel and the time constant of this exponential decay was determined for each cell.

Statistical analysis

Group measures were expressed as mean \pm standard error of the mean; error bars also indicate standard error of the mean. We used the Student's *t*-test to assess the statistical significance of differences between control and experimental conditions.

Results

MLC1 expression-related chloride currents in transfected cells

To address the question whether MLC1 could have a role in ion transport, we transfected different cell types with constructs

expressing wild-type MLC1 and used the whole-cell patch clamp technique to test whether ionic currents were induced. Figures 2–5 illustrate current profiles in the cell types investigated, each figure representing a specific cell type. Quantitative results of all electrophysiological experiments are given in Table 2.

Initial patch clamp data in transfected HEK293 cells expressing either green fluorescent protein as a control or wild-type MLC1, and using different recording media indicated that MLC1 contributed to small ionic currents that became visible in particular at highly positive membrane potentials and are carried either by an influx of anions or an efflux of cations (data not shown). To test which ion carries the currents observed in MLC1-transfected HEK293 cells, we first eliminated the contribution of the monovalent cations sodium and potassium in the pipette and bath solutions by the impermeant cation *N*-methyl-D-glucamine. Under these conditions, a small inward current was observed at negative potentials in HEK293 cells transfected with the control green fluorescent protein construct that reversed at 0 mV (Fig. 2A, Table 2). In MLC1-transfected HEK293 cells, a stronger inward current was observed at negative potentials, which also reversed \sim 0 mV and showed outward rectification (Fig. 2A, Table 2). Anion channels have a very low permeability for gluconate (Nilius and Droogmans, 2003). Replacing chloride by gluconate in bath and pipette filling solutions almost completely abolished the inward and outward currents (Fig. 2B), demonstrating that the MLC1 expression-induced current is carried by chloride. Given the

Table 2 Whole-cell chloride current and current density values

Cell type	Condition	Blocker	Transfection/ infection	n	Average pF ± SEM	Average pA ± SEM	pA/pF	Average pA ± SEM	pA/pF										
HEK293	Iso	–	GFP	9	17.8 ± 1.7	–14 ± 2	–0.8	42 ± 4	2.4										
	Iso	–	wt MLC1	7	16.1 ± 1.0	–92 ± 12	–3.1	181 ± 27	8.6										
	Iso	Tamoxifen	wt MLC1	8	14.0 ± 1.3	–28 ± 23	–2.0	30 ± 22	2.0										
	Iso	–	MLC1_Ser93Leu	6	19.3 ± 1.5	–17 ± 1	–0.9	35 ± 4	1.8										
	Iso	–	MLC1_Cys326Arg	5	16.8 ± 2.5	–10 ± 5	–0.6	37 ± 6	2.2										
HeLa	Iso	–	GFP	4	25.4 ± 2.5	–48 ± 19	–1.9	69 ± 20	2.7										
	Iso	–	wt MLC1	8	26.3 ± 3.0	–110 ± 16	–4.2	369 ± 125	14.0										
Sf9	Hypo	–	GFP	8	14.7 ± 1.7	–19 ± 9	–1.3	53 ± 2	3.6										
	Hypo	–	wt MLC1	12	14.2 ± 0.8	–91 ± 39	–6.9	256 ± 16	19.4										
	Hypo	Tamoxifen	wt MLC1	8	13.0 ± 0.8	–20 ± 3	–1.5	55 ± 9	4.3										
	Hypo	–	MLC1_Ser93Leu	11	14.4 ± 0.7	–26 ± 8	–1.7	67 ± 5	4.5										
	Hypo	–	MLC1_Cys326Arg	11	15.0 ± 1.0	–103 ± 12	–7.0	75 ± 4	5.1										
Lymphoblasts	Control	Iso	–	–	13	14.9 ± 1.0	–53 ± 9	–3.5	90 ± 19	6.0									
											Hypo	–	–	9	10.5 ± 1.7	–99 ± 14	–9.4	211 ± 23	20.1
	Patient 1	Iso	–	–	9	10.7 ± 0.8	–25 ± 11	–2.3	28 ± 11	2.6									
											Hypo	–	–	7	13.3 ± 1.2	–31 ± 13	–2.4	32 ± 13	2.4
	Patient 2	Iso	–	–	10	8.5 ± 0.5	–25 ± 10	–3.0	33 ± 10	4.0									
											Hypo	–	–	9	9.3 ± 0.3	–29 ± 13	–3.1	34 ± 10	3.7
	Astrocytes	Trypsin	–	nt siRNA	12	58.9 ± 4.6	–175 ± 36	–3.0	910 ± 36	15.4									
											–	MLC1 siRNA	14	64.1 ± 5.8	–88 ± 40	–1.4	380 ± 40	5.9	
											–	LacZ	11	71.9 ± 5.3	–178 ± 44	–2.5	881 ± 44	12.2	
–											wt MLC1	11	79.5 ± 7.7	699 ± 152	–8.8	2563 ± 152	32.3		
–											MLC1_Ser246Arg	12	72.3 ± 7.7	–243 ± 54	–3.4	975 ± 54	13.5		
–											MLC1 siRNA + wtMLC1	8	94.0 ± 8.2	–666 ± 49	–7.1	2408 ± 49	25.3		
NPPB											wt MLC1	6	73.5 ± 12.3	–128 ± 66	–1.9	435 ± 68	6.5		
Zinc											wt MLC1	5	79.4 ± 16	–142 ± 43	–1.8	656 ± 140	8.3		
DIDS											wt MLC1	5	85.2 ± 9.5	–296 ± 72	–3.5	869 ± 90	10.2		
Tamoxifen											wt MLC1	5	78.6 ± 15.5	–79 ± 13	–1.0	314 ± 57	4.1		

GFP = green fluorescent protein; hypo = hypo-osmotic treatment before electrophysiological measurements; iso = iso-osmotic treatment before electrophysiological measurements; nt siRNA = non-targeted silencing RNA; pA = picoAmpere; pF = picoFarad; trypsin = mild trypsinization before electrophysiological measurements; wt = wild-type.

nature of the voltage clamp protocol, the current measured in MLC1-overexpressing cells appeared to be a steady-state current.

HEK293 cells have a low endogenous MLC1 expression (Supplementary Table 2), which was undetectable in antibody staining (data not shown). To exclude influence of the low endogenous MLC1 expression in HEK293 cells, we also tested HeLa cells, which lack endogenous MLC1 expression (Supplementary Table 2). In HeLa cells, the current profiles were highly similar to those observed in HEK293 cells (Fig. 2A and C). For practical reasons we used HEK293 cells for further experiments.

We studied chloride currents in transfected Sf9 insect cells, which lack the *MLC1* gene and therefore any possible endogenous MLC1 expression. Expression of MLC1 in Sf9 cells did not affect chloride currents under standard conditions (Fig. 3A). Because MLC1 is localized in astrocytes (Schmitt *et al.*, 2003; Teijido *et al.*, 2004; Boor *et al.*, 2005) and many chloride currents

in astrocytes are volume sensitive (Abdullaev *et al.*, 2006), we applied pretreatment with hypo-osmotic solutions (Fig. 1C) in transfected Sf9 cells to induce cell swelling. Hypotonic pretreatment robustly increased the currents at negative and positive voltages in MLC1-expressing Sf9 cells (Fig. 3B, Table 2). As observed in MLC1-transfected HEK293 and HeLa cells (Fig. 2A and C) the current profiles of the MLC1-transfected Sf9 cells after hypo-osmotic pretreatment also showed outward rectification with a small negative reversal current.

MLC1 expression-related chloride currents in primary astrocytes

In the brain MLC1 is predominantly expressed in astrocytes. We therefore studied chloride currents in cultured rat primary astrocytes. We chose rat astrocytes, because these are readily available

and have been used before for similar patch clamp experiments (Lascola and Kraig, 1996; Abdullaev *et al.*, 2006). In these cells, MLC1 was demonstrated in the cell plasma membrane and the endoplasmic reticulum (Supplementary Fig. 3).

In uninfected astrocytes, small-amplitude chloride currents were observed that were increased by hypo-osmotic pretreatment (data not shown). To alter expression of MLC1 we infected the

astrocytes with adenoviruses expressing human haemagglutinin-tagged MLC1 to increase expression or with adenoviruses expressing small interfering RNA directed against MLC1 to reduce expression (Supplementary Fig. 3A and G; Duarri *et al.*, 2011). Astrocytes infected with adenoviruses expressing, respectively, LacZ or small interfering RNA without messenger RNA target served as controls (Supplementary Fig. 3E). Adenovirus-infected

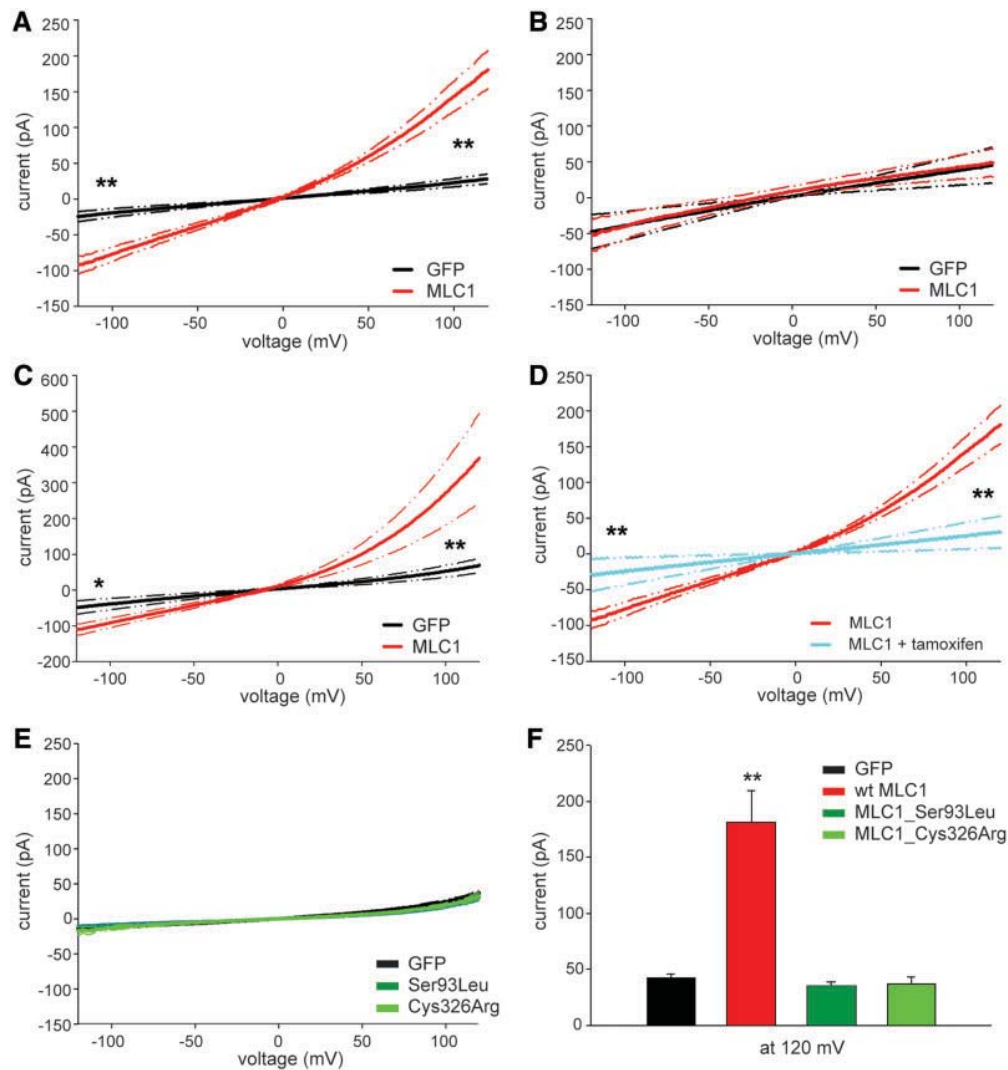


Figure 2 MLC1-expression-related chloride currents in HEK293 and HeLa cells. (A) Current–voltage (*I*–*V*) relationships of control (*black trace*, *n* = 9) and MLC1-transfected HEK293 cells (*red trace*, *n* = 7). (B) *I*–*V* relationship of control HEK293 cells (*black trace*, *n* = 3) and MLC1-transfected HEK293 cells (*red trace*, *n* = 4) with replacement of chloride in both bath and pipette-filling solutions by equimolar amounts of gluconate. (C) *I*–*V* relationships of control (*black trace*, *n* = 4) and MLC1-transfected HeLa cells (*red trace*, *n* = 8). (D) *I*–*V* relationship of MLC1-transfected HEK293 cells (*red trace*, *n* = 7) after adding 10 μ M Tamoxifen (*light blue trace*, *n* = 4) to the bath solution. (E) The average *I*–*V* relationship of whole-cell chloride current in control (*black trace*, *n* = 4), MLC1_Ser93Leu (*dark green trace*, *n* = 6) and MLC1_Cys326Arg (*light green trace*, *n* = 5) expressing HEK293 cells. (F) The amplitude of the chloride current at 120 mV in control HEK293 cells (*black bar*, *n* = 6), HEK293 cells overexpressing wild-type (wt) MLC1 (*red bar*, *n* = 6), MLC1_Ser93Leu (*dark green bar*, *n* = 6) and MLC1_Cys326Arg (*light green bar*, *n* = 5). Currents measured in HEK293 cells overexpressing wild-type MLC1 were significantly different from those measured in control cells and cells overexpressing mutant MLC1. The *I*–*V* profiles of the MLC1-transfected cells were outwardly rectifying. Statistically significant differences are indicated by asterisks (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). GFP = green fluorescent protein.

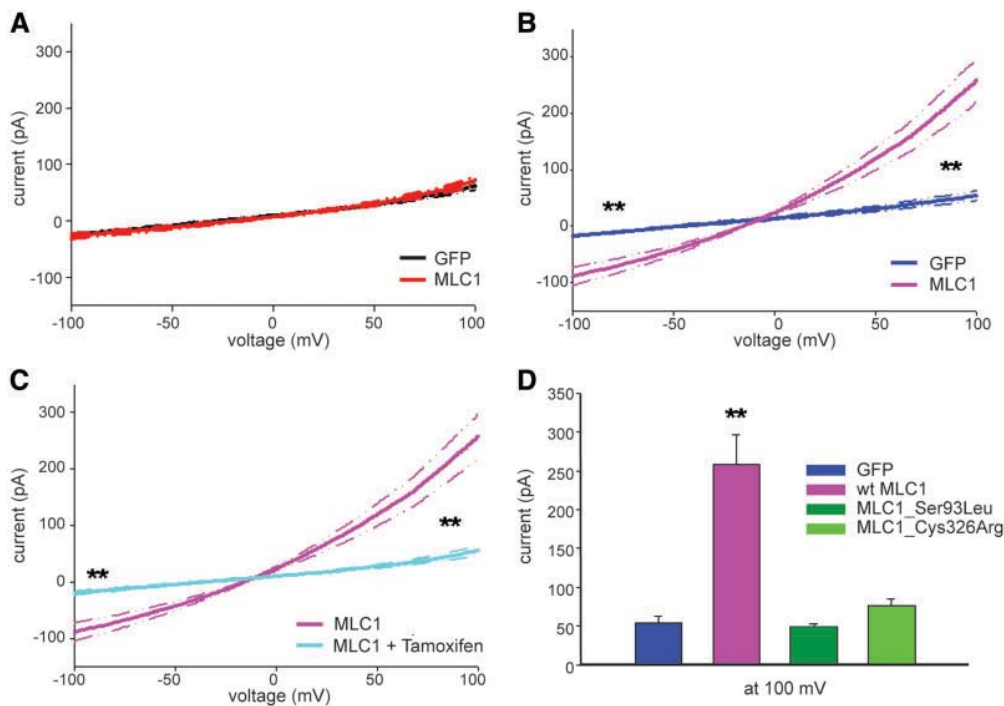


Figure 3 MLC1-expression-related chloride currents in Sf9 cells. (A) Current–voltage (*I*–*V*) relationships of control (black trace, *n* = 8) and MLC1-transfected Sf9 cells (red trace, *n* = 9). (B) *I*–*V* relationship obtained after hypo-osmotic pretreatment of control (dark blue trace, *n* = 8) and MLC1-transfected Sf9 cells (purple trace, *n* = 12). (C) *I*–*V* relationship obtained after hypo-osmotic pretreatment of MLC1-transfected Sf9 cells (purple trace, *n* = 12) and after adding 2 μM Tamoxifen (light blue trace, *n* = 8) to the bath solution during the hypotonic pretreatment and to the isotonic medium during recording. (D) The amplitude of the chloride current obtained after hypo-osmotic pretreatment at 100 mV in Sf9 cells overexpressing wild-type (wt) MLC1 (purple bar, *n* = 12), in control Sf9 cells overexpressing green fluorescent protein (GFP) (blue bar, *n* = 8), and in Sf9 cells overexpressing mutant MLC1_Ser93Leu (dark green bar, *n* = 10) and mutant MLC1_Cys326Arg (light green bar, *n* = 10). Currents measured in Sf9 cells overexpressing wild-type MLC1 were significantly different from those measured in control cells and cells overexpressing mutant MLC1. The *I*–*V* profiles of the MLC1-transfected cells are outwardly rectifying. Statistically significant differences are indicated by asterisks (***P* < 0.01).

astrocytes were less viable after hypo-osmotic treatment than uninfected cells, showed greater difficulty to seal to the patch pipette and were generally very difficult to record from. Instead of hypo-osmotic pretreatment we, therefore, used a mild treatment with trypsin, which causes morphological changes in the astrocytes and induces the same chloride currents as hypo-osmotic pretreatment (Lascola and Kraig, 1996). In trypsin-treated astrocytes expressing LacZ or non-targeted small interfering RNA, the chloride current profiles were similar to those seen in MLC1-transfected Sf9 cells after hypo-osmotic pretreatment (Fig. 4A and B), although the peak current amplitudes of the astrocytes were higher. This difference can mainly be explained by the difference in size and, thus the membrane capacitance of the different cell types (Table 2). Note that within experiments with a certain cell type, the sizes of the cells were similar to each other (Table 2); differences in cell size therefore cannot underlie the observed changes in currents under different experimental conditions.

Overexpression of wild-type MLC1 by infection of astrocytes resulted in a large increase in the amplitude of the currents after trypsin pretreatment compared with cells overexpressing LacZ as control (Fig. 4A–C, Table 2).

The expression of the endogenous MLC1 protein was reduced by ~90% by small interfering RNA directed against MLC1 (Supplementary Fig. 3E–H, Supplementary Table 2). In these silenced astrocytes chloride currents recorded after trypsin pretreatment were significantly reduced (Fig. 4B and C, Table 2).

In cells with reduced MLC1 levels due to small interfering RNA, overexpression of human wild-type MLC1 restored the reduced chloride currents to high levels (Fig. 4C, Table 2), indicating that the effects were specific to the loss of MLC1.

In these experiments with primary astrocytes, the chloride current profiles showed heterogeneity (Supplementary Fig. 4) similar to previously reported findings in astrocytes (Lascola and Kraig, 1996). Heterogeneity was seen under all conditions (MLC1 overexpression or knock-down and in the respective controls). The different activation and inactivation characteristics are most likely explained by the presence of other chloride channels.

Potassium and chloride are the most important ions in the regulation of water homeostasis by astrocytes. We therefore tested whether potassium currents would be influenced by MLC1 in

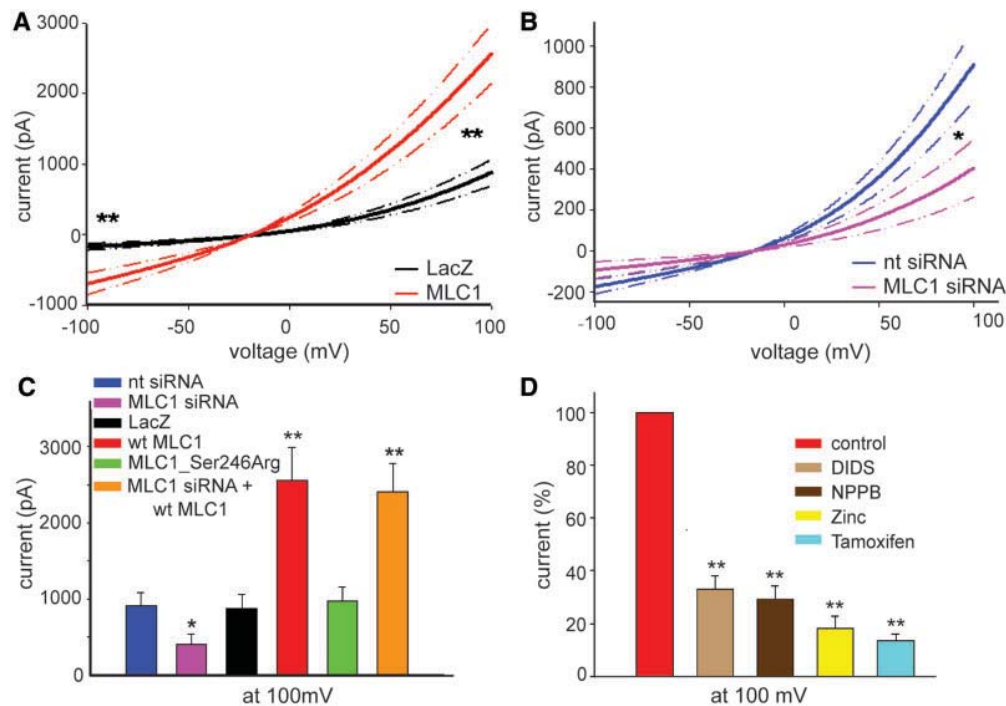


Figure 4 MLC1-expression-related chloride currents in primary rat astrocytes. (A) Chloride currents in astrocytes overexpressing human MLC1 (red trace, $n = 11$) or LacZ as a control (black trace, $n = 10$) after mild trypsin treatment to activate chloride currents. (B) Current–voltage (I – V) relationship of astrocytes expressing small interfering RNAs [non-targeted silencing RNA (nt siRNA) as control, dark blue trace, $n = 11$] or directed against MLC1 (purple trace, $n = 8$) after mild trypsin treatment. (C) Amplitudes at 100 mV for astrocytes under diverse conditions: expressing non-targeted small interfering RNA (dark blue, $n = 12$), expressing small interfering RNA against rat MLC1 (purple, $n = 14$), expressing lacZ (black, $n = 11$), overexpressing human wild-type (wt) MLC1 (red, $n = 11$), overexpressing mutant human MLC1 [Ser246Arg] (green, $n = 12$) or expressing small interfering RNA against rat MLC1 and overexpressing human wild-type MLC1 together (orange, $n = 8$). (D) Amplitudes of chloride currents at 100 mV after mild trypsin pretreatment of astrocytes expressing haemagglutinin-MLC1 either in the absence (control, red, $n = 16$) or in the presence of chloride channel blockers [DIDS (light brown, $n = 5$), NPPB (dark brown, $n = 6$), Zinc (yellow, $n = 6$) or Tamoxifen (light blue, $n = 6$)]. The average amplitude of the control cells was set as 100%. For all panels: statistically significant differences are indicated by asterisks ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

astrocytes. Potassium currents were not affected by increased or decreased expression of MLC1 (Supplementary Fig. 5), showing that the currents observed are not caused by side effects of the altered MLC1 expression on, for example, voltage-gated potassium channels (Benfenati *et al.*, 2007).

MLC1 expression-related chloride currents in lymphoblasts

MLC1 is expressed in the brain and in white blood cells. White blood cells are much easier to obtain from human patients and control subjects than astrocytes. We used human lymphoblasts endogenously expressing MLC1 for further studies. In control lymphoblasts, in which chloride currents were small under normal conditions, hypotonic pretreatment increased the currents at negative and positive voltages (Fig. 5A, Table 2) with current profiles similar to the profiles observed in MLC1-transfected Sf9 cells after hypotonic pretreatment (Fig. 3B).

Effect of ion channel blockers

Tamoxifen is known to block volume-regulated anion channels (VRACs; Zhang *et al.*, 1994). Added to the bath solution it strongly reduced the chloride currents in MLC1-transfected HEK293 cells (Fig. 2D, Table 2). Tamoxifen also strongly inhibited the currents induced by hypotonic conditions in MLC1-transfected Sf9 cells (Fig. 3C), astrocytes overexpressing MLC1 (Fig. 4D) and control lymphoblasts (Fig. 5B). In all cases, currents were reduced ~80% at 100 mV (Table 2).

The rat astrocytes expressing human MLC1 were also used to test other ion channel blockers, i.e. Zinc, NPPB and DIDS (Lascola and Kraig, 1996; Benfenati *et al.*, 2007). All blockers significantly reduced the chloride currents (Fig. 4D, Table 2).

MLC1 mutations abolish chloride currents

We introduced missense mutations, which have been observed in a homozygous state in patients, in MLC1 expression constructs

(Boor *et al.*, 2006). The chloride currents observed in cells expressing wild-type MLC1 were absent in HEK293 cells expressing MLC1_Ser93Leu or MLC1_Cys326Arg (Fig. 2E and F), and after hypotonic pretreatment in Sf9 cells expressing MLC1_Ser93Leu or MLC1_Cys326Arg (Fig. 3D) and rat astrocytes expressing MLC1_Ser246Arg (Fig. 4C).

Lymphoblasts were obtained from MLC1 patients, who were either homozygous for an insertion resulting in a frameshift and a premature stop or homozygous for a missense mutation (Table 1). In both lymphoblast lines hypo-osmotic pretreatment failed to induce chloride currents (Fig. 5C–E).

Volume regulation is impaired in patient-derived lymphoblasts and MLC1-silenced astrocytes

We studied whether the failure to induce chloride currents in lymphoblasts of patients and the reduced chloride currents in MLC1-silenced astrocytes upon hypotonic shock was associated with an impaired regulatory volume decrease that follows hypotonia-induced cell swelling. Lymphoblasts and astrocytes were exposed to the chloride-selective hypotonic solution in the

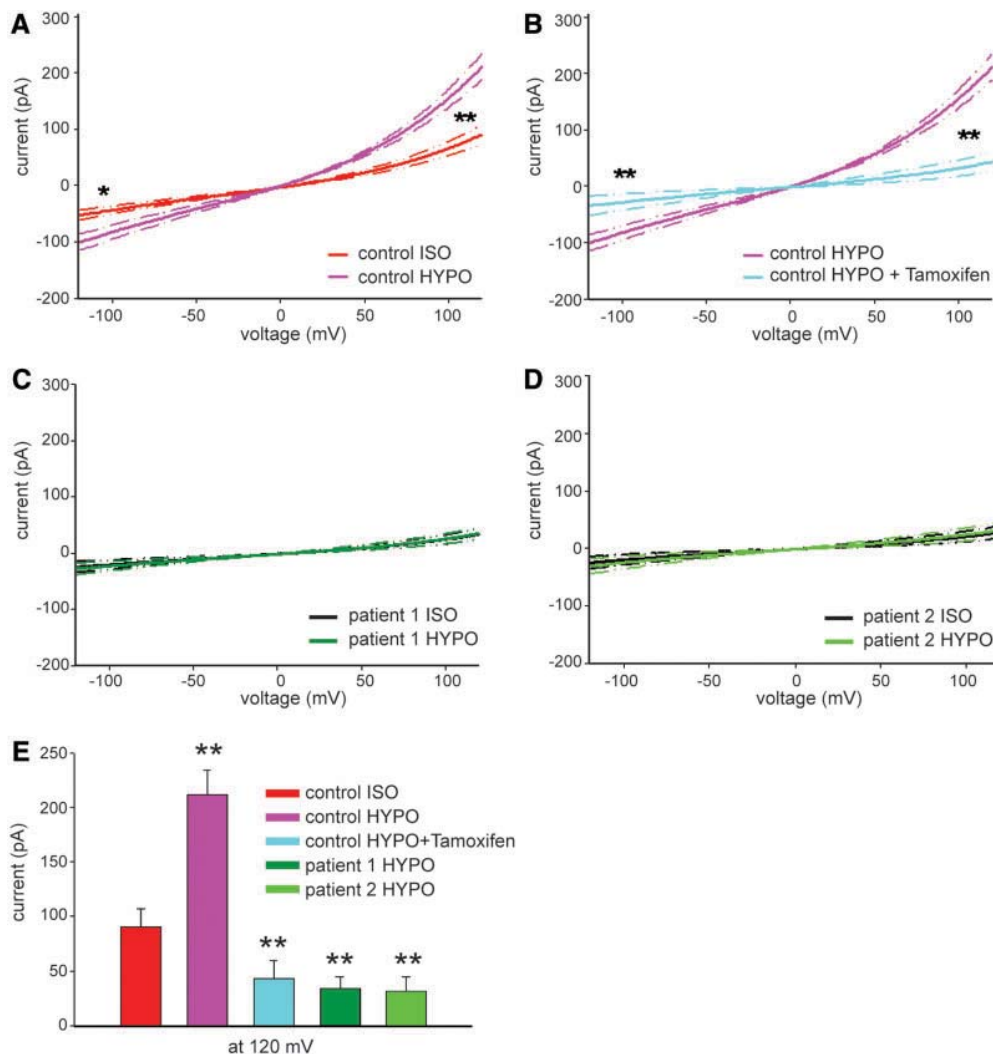


Figure 5 Chloride currents in lymphoblasts. (A) Current–voltage (I – V) relationship of control lymphoblasts obtained after iso- (ISO, red trace, $n = 13$) and hypo-osmotic (HYPO, purple trace, $n = 9$) pretreatment. (B) I – V relationship of control lymphoblasts obtained after hypo-osmotic pretreatment (purple trace, $n = 9$) and after adding $10\mu\text{M}$ Tamoxifen (light blue trace, $n = 5$) to the bath solution during the hypotonic pretreatment and to the isotonic medium during recording. (C) I – V relationship of lymphoblasts derived from Patient 1 obtained after iso- (black trace, $n = 9$) and hypo-osmotic (dark green trace, $n = 7$) pretreatment. (D) I – V relationship of lymphoblasts derived from Patient 2 obtained after iso- (black trace, $n = 10$) and hypo-osmotic (light green trace, $n = 9$) pretreatment. (E) The amplitude of the chloride currents obtained at 120 mV for control and patient lymphoblasts after iso- and hypotonic pretreatment and in the absence or presence of Tamoxifen, as indicated. Statistically significant differences with control cells and conditions (red) are indicated by asterisks ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

presence of gramicidin. Gramicidin forms pores for monovalent cations, allowing free exchange mainly of potassium, thereby excluding this ion from playing a role in the regulatory volume decrease (Pasantes-Morales *et al.*, 1994). Cell volume recovery was significantly slower ($P < 0.001$) in lymphoblasts from Patients 1 and 2 (Table 1) than in the three control lymphoblast lines (Fig. 6F). The same trend of decreased rate of cell volume recovery was observed ($P = 0.067$) in MLC1-silenced astrocytes (Fig. 6B–D and F). Although we observed a trend towards reduced maximum swelling after exposure to the hypotonic solution in MLC1-silenced astrocytes compared with control astrocytes ($P = 0.056$) (Fig. 6B), we did not observe a difference in maximum swelling between patient-derived and control lymphoblasts ($P < 0.001$; Fig. 6A). The normal cell volume recovery was restored in MLC1-silenced astrocytes by overexpression of human wild-type MLC1 (Fig. 6B, C, E and F). After reintroduction of chloride selective isotonic solution, regulatory volume increase was nearly absent in all lymphoblasts and astrocytes (Fig. 6A and B). Regulatory volume increase is highly dependent on influx of monovalent cations (Hoffmann *et al.*, 2009), which were absent in our solutions.

Discussion

Patients with MLC are normal at birth and develop macrocephaly during the first year of life (van der Knaap *et al.*, 1995). MRI at that time reveals abnormal and swollen cerebral white matter with highly increased water content (van der Knaap *et al.*, 1995; van der Voorn *et al.*, 2006). Electron microscopy of brain tissue from a patient with MLC demonstrates that fluid-filled vacuoles within myelin sheaths (van der Knaap *et al.*, 1996) and, to a lesser extent, astrocytic endfeet (Duarri *et al.*, 2011) form the anatomic substrate of the white matter oedema. Cerebral white matter contains little myelin at birth and acquires most of its myelin during the first year of life. Thus, the macrocephaly and neuroradiological characteristics of MLC develop during a period of rapid myelin deposition, suggesting that the vacuoles are formed during this process. We have shown previously that *MLC1* mutations cause MLC (Leegwater *et al.*, 2001; Boor *et al.*, 2006). The MLC1 protein is located mainly in the brain in astrocyte–astrocyte junctions adjacent to the blood–brain and CSF–brain barriers (Teijido *et al.*, 2004; Boor *et al.*, 2005; Duarri *et al.*, 2011). Its function has remained unknown.

We demonstrate an association between MLC1 expression and chloride currents in different cell types, most importantly in patient-derived lymphoblasts and astrocytes, the cells that normally mainly express the MLC1 protein. Previous negative results to find ion channel activity related to MLC1 may be due to the inability to identify the opening conditions of the channel or to the specific experimental conditions (Kaganovich *et al.*, 2004; Teijido *et al.*, 2004) (Supplementary Fig. 2). The ion substitution experiments, current–voltage profile, the activation by hypo-osmotic pretreatment causing cell swelling, and the sensitivity to inhibition by Tamoxifen and other ion channel blockers indicate that the increase in current amplitude induced by MLC1 expression is due to increased VRAC activity (Lascola and Kraig, 1996;

Jentsch *et al.*, 2002; Nilius and Droogmans, 2003; Abdullaev *et al.*, 2006).

Water homeostasis and osmotic balance are vital in the brain and astrocytes are central in this process. They are highly sensitive to changes in extracellular osmolarity and can display prominent cell volume changes as part of the osmoregulatory process (Simard and Nedergaard, 2004; Nedergaard and Dirnagl, 2005; Benfenati *et al.*, 2007; Benfenati and Ferroni, 2010). Any physiological or pathological osmotic perturbation induces a transmembrane flow of ions and water that rapidly restores the osmotic equilibrium and induces temporary swelling or shrinkage of cells, followed by regulatory volume decrease or regulatory volume increase, respectively, to normalize cell volume. The regulatory volume decrease is caused by activation of ion channels and transporters that allow effluxes of potassium, chloride, organic osmolytes and water (Pasantes-Morales *et al.*, 2006). VRACs, which are activated by water fluxes, changes in cell shape and signal transduction events (Mulligan and MacVicar, 2006; Stutzin and Hoffmann, 2006), play an important role in the regulatory volume decrease. VRAC function is most likely dependent on multiple channels, which could be different for different cell types. The molecular identity of most of these channels is unknown (Jentsch *et al.*, 2002; Nilius and Droogmans, 2003). Our study with patient-derived lymphoblasts shows that a defect in MLC1 not only decreases VRAC-related chloride currents but also the rate of the regulatory volume decrease. Similar findings were obtained from MLC1-silenced astrocytes, with the addition of a rescue experiment with human wild-type MLC1.

The variation in the rate of the regulatory volume decrease was larger in MLC1-silenced astrocytes than in patient lymphoblasts. Consequently, the *P*-value for the difference between MLC1-silenced and wild-type astrocytes was higher than for the difference between patient and control lymphoblasts. The larger variation in astrocytes is most likely due to variation in the degree of MLC1 knockdown in MLC1-silenced astrocytes, a problem not shared by patient lymphoblasts. As such, patient-derived lymphoblasts are a more consistent system to study effects of mutant or absent MLC1. The difference in degree of swelling of MLC1-silenced and wild-type astrocytes after hypotonic exposure was not observed in patient versus control lymphoblasts. Currently we have no explanation for this observation in astrocytes.

We performed our experiments in the presence of gramicidin and used chloride-selective medium, to enhance the dependency of the experiments on chloride. Yet, with this experimental set-up the regulatory volume decrease is not exclusively dependent on the MLC1-related chloride channel function; it depends in part on the efflux of organic osmolytes and on other chloride channels, not related to MLC1. This explains why the regulatory volume decrease is slower and not abolished in the absence of normal MLC1. MLC is not an immediately life-threatening disease. Complete abolition of the regulatory volume decrease is probably not compatible with life. At present it is still an open question whether MLC1 is a VRAC, a component of a VRAC or a protein that activates a VRAC, either directly or indirectly.

Recessive *MLC1* mutations are responsible for ~75% of the MLC patients (Leegwater *et al.*, 2001; Boor *et al.*, 2006). We have recently shown that mutations in *GLIALCAM*, coding for

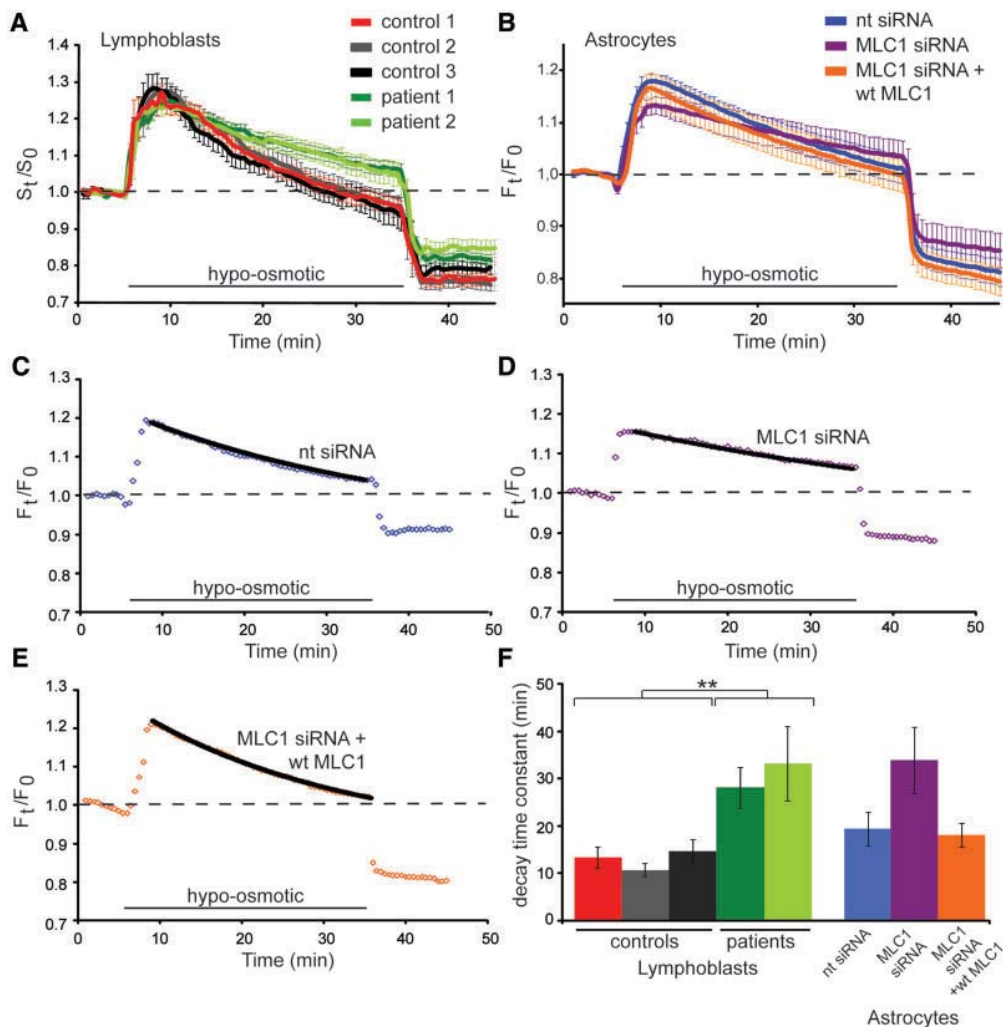


Figure 6 MLC1-dependent regulatory volume decrease. Cells were bathed in a chloride-selective iso-osmotic solution that was switched to a hypo-osmotic chloride-selective solution for 30 min as indicated in (A–E) (black bar). Gramicidin was used in all experiments. (A) Average relative cell surface, obtained under iso- and hypo-osmotic conditions, from lymphoblasts of three controls (control 1, red trace, $n = 34$; control 2, dark grey, $n = 14$; and control 3, black trace $n = 15$) and two patients with MLC (Patient 1, dark green trace, $n = 39$; Patient 2, light green trace $n = 15$). (B) Average relative fluorescence, obtained under iso- and hypo-osmotic conditions, from astrocytes expressing non-targeted small interfering RNA (nt siRNA, dark blue, $n = 11$), small interfering RNA against rat MLC1 (purple, $n = 9$) or small interfering RNA against rat MLC1 in combination with expression of human wild-type (wt) MLC1 (orange, $n = 7$). Individual typical regulatory volume decrease quenching traces fitted with an exponential curve are depicted for an astrocyte expressing non-targeted small interfering RNA (C), an astrocyte expressing small interfering RNA against rat MLC1 (D) and an astrocyte expressing small interfering RNA against rat MLC1 in combination with expression of human wild-type MLC1 (E). (F) Average regulatory volume decrease decay time constants of all lymphoblasts used for A (control 1, red; control 2, grey; control 3, black; Patient 1, dark green; Patient 2, light green) are indicated on the left. Average regulatory volume decrease decay time constants of all astrocytes used for B (non-targeted small interfering RNA, dark blue; small interfering RNA against rat MLC1, purple; small interfering RNA against rat MLC1 in combination with expression of human wild-type MLC1, orange) are indicated on the right. Statistically significant differences are indicated by asterisks (** $P < 0.01$).

hepatic and glial cell adhesion molecule GlialCAM, also cause MLC (Lopez-Hernandez *et al.*, 2011). Patients with recessive *GLIALCAM* mutations have classical MLC, while patients with dominant *GLIALCAM* mutations show transient clinical and MRI features of MLC (van der Knaap *et al.*, 2010; Lopez-Hernandez *et al.*, 2011). GlialCAM is an immunoglobulin-like cell adhesion molecule that is required for the proper localization of MLC1 in

astrocytes–astrocyte junctions (Lopez-Hernandez *et al.*, 2011). All types of *MLC1* mutations cause decreased membrane expression of the *MLC1* protein (Duarri *et al.*, 2008) and *GLIALCAM* mutations disrupt the localization of *MLC1*, which explains why *MLC1* and *GLIALCAM* mutations cause the same disease. Why patients with dominant *GLIALCAM* mutations have transient features of MLC remains to be explained. In any case, this observation

suggests that MLC1 has its most important role during the process of myelin deposition. This conclusion is in line with another observation that all myelin-producing organisms have the *MLC1* gene, whereas organisms that do not produce myelin do not (Boor *et al.*, 2005).

Brain ion channel defects have been associated with epilepsy syndromes, migraine, dyskinesia and episodic ataxia (Cannon, 2006). There is no known human leucoencephalopathy related to ion channel dysfunction. There is also no known human disease caused by a defect in a chloride channel involved in cell volume regulation. The *CLCN2*-knockout mouse, however, has a leucoencephalopathy. *CLCN2* encodes the chloride channel ClC-2, which, like MLC1, is localized in the brain in astrocytic endfeet lining blood vessels (Blanz *et al.*, 2007). Remarkably, *CLCN2*-knockout mice display widespread cerebral white matter oedema and intramyelinic vacuole formation, similar to what is seen in the brain of human patients with MLC (van der Knaap *et al.*, 1996; Blanz *et al.*, 2007). Because of the striking similarities between patients with MLC and the *CLCN2*-knockout mice, *CLCN2* was investigated as a possible candidate gene for MLC, but *CLCN2* mutations were not found among patients with MLC without *MLC1* mutations (Scheper *et al.*, 2010). ClC-2 has a more widespread expression than MLC1 and *CLCN2*-knockout mice have involvement of other organs than the brain (Blanz *et al.*, 2007). MLC1 is only present in leucocytes and the brain (Boor *et al.*, 2005; Duarri *et al.*, 2008), but patients only have a brain disease. This exclusive brain involvement is most likely explained by the much higher MLC1 expression in the brain than in leucocytes (Supplementary Table 2).

MLC is characterized by chronic cerebral white matter oedema and slow neurological deterioration. The fact that the *CLCN2*-knockout mice also display widespread cerebral white matter oedema and intramyelinic vacuole formation supports our conclusion that a disturbance of volume-regulated chloride channel activity underlies the white matter disease in MLC. At this point we do not know how a defect in cell volume regulation leads to water accumulation within astrocytic endfeet and myelin sheaths during myelination and to delayed-onset neurological deterioration. A better understanding of disease mechanisms is essential for the development of treatment. The transient MLC phenotype of the patients with a dominant *GLIALCAM* mutation suggests that there is a window of time, in which rescue of MLC1 function may prevent the disease or modify its course.

Acknowledgements

We thank Carola van Berkel, Emiel Polder and Boukje Beuger for their excellent technical assistance. We thank Dr James M. Powers, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA, for critical reading of the manuscript.

Funding

Dutch Organization for Scientific Research (ZonMw, grants 903-42-097, 9120.6002 and 917.76.360); VU University Board

(Stg VU-ERC); The Hersenstichting (grants 13F05.04, 15F07.30 and 2009[2]-14); the Optimix Foundation for Scientific Research, Ministerio de Ciencia y Tecnologia (SAF2009-07014); ERARE (grants PS09/02672 and 11-330-1024); European Leukodystrophy Association Foundation (grants 2009-017C4 and 2009 SGR 719).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Abdullaev IF, Rudkouskaya A, Schools GP, Kimelberg HK, Mongin AA. Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl⁻ currents in cultured rat astrocytes. *J Physiol* 2006; 572: 677–89.
- Benfenati V, Ferroni S. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 2010; 168: 926–40.
- Benfenati V, Nicchia GP, Svelto M, Rapisarda C, Frigeri A, Ferroni S. Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 2007; 100: 87–104.
- Blanz J, Schweizer M, Auberson M, Maier H, Muenscher A, Hubner CA, et al. Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J Neurosci* 2007; 27: 6581–9.
- Boor I, de Groot K, Mejaski-Bosnjak V, Brenner C, van der Knaap MS, Scheper GC, et al. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum Mutat* 2006; 27: 505–12.
- Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q, Kamphorst W, Oudejans CB, Powers JM, et al. MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 412–9.
- Cannon SC. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 387–415.
- Crowe WE, Altamirano J, Huerto L, Alvarez-Leefmans FJ. Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* 1995; 69: 283–96.
- Duarri A, Lopez de Heredia M, Capdevila-Nortes X, Ridder MC, Montolio M, Lopez-Hernandez T, et al. Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 228–38.
- Duarri A, Teijido O, Lopez-Hernandez T, Scheper GC, Barriere H, Boor I, et al. Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3728–39.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391: 85–100.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009; 89: 193–277.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503–68.
- Kaganovich M, Peretz A, Ritsner M, Bening Abu-Shach U, Attali B, Navon R. Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 125: 31–7.
- Larsen EH, Gabrieli SE, Stutts MJ, Fullton J, Price EM, Boucher RC. Endogenous chloride channels of insect sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. *J Gen Physiol* 1996; 107: 695–714.
- Lascola CD, Kraig RP. Whole-cell chloride currents in rat astrocytes accompany changes in cell morphology. *J Neurosci* 1996; 16: 2532–45.

- Leegwater PA, Yuan BQ, van der Steen J, Mulders J, Konst AA, Boor PK, et al. Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 831–8.
- Lopez-Hernandez T, Ridder MC, Montolio M, Capdevila-Nortes X, Polder E, Sirisi S, et al. Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 422–32.
- Mulligan SJ, MacVicar BA. VRACs CARVe a path for novel mechanisms of communication in the CNS. *Sci STKE* 2006; 357: pe42.
- Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 2005; 50: 281–6.
- Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 119–47.
- Pasantés-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G, Tuz KL. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 2006; 119: S4–11.
- Pasantés-Morales H, Murray RA, Lilja L, Moran J. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol* 1994; 266: 165–71.
- Scheper GC, van Berkel CG, Leisle L, de Groot KE, Errami A, Jentsch TJ, et al. Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14: 255–7.
- Schmitt A, Gofferje V, Weber M, Meyer J, Mossner R, Lesch KP. The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* 2003; 44: 283–95.
- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 2004; 129: 877–96.
- Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C426–32.
- Stutzin A, Hoffmann EK. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol* 2006; 187: 27–42.
- Teijido O, Martínez A, Pusch M, Zorzano A, Soriano E, Del Rio JA, et al. Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2581–94.
- van der Knaap MS, Barth PG, Stroink H, van Nieuwenhuizen O, Arts WF, Hoogenraad F, et al. Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol* 1995; 37: 324–34.
- van der Knaap MS, Barth PG, Vrensen GF, Valk J. Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol* 1996; 92: 206–12.
- van der Knaap MS, Lai V, Kohler W, Salih MA, Fonseca MJ, Benke TA, et al. Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts without MLC1 defect. *Ann Neurol* 2010; 67: 834–7.
- van der Voorn JP, Pouwels PJ, Hart AA, Serrarens J, Willemsen MA, Kremer HP, et al. Childhood white matter disorders: quantitative MR imaging and spectroscopy. *Radiology* 2006; 241: 510–7.
- van Kollenburg B, Thomas AA, Vermeulen G, Bertrand GA, van Berkel CG, Pronk JC, et al. Regulation of protein synthesis in lymphoblasts from vanishing white matter patients. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 496–504.
- Xiong H, Li C, Garami E, Wang Y, Ramjeesingh M, Galley K, et al. CIC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J Membr Biol* 1999; 167: 215–21.
- Zhang JJ, Jacob TJ, Valverde MA, Hardy SP, Mintenig GM, Sepulveda FV, et al. Tamoxifen blocks chloride channels. A possible mechanism for cataract formation. *J Clin Invest* 1994; 94: 1690–7.

A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells

Article publicat l'abril del 2012 a la revista Analytical Biochemistry.

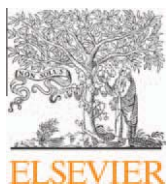
Contribució:

Construcció dels constructes necessaris per posar a punt el mètode Split-TEV amb totes les proteïnes control i totes les variacions del mètode.

Implementació del mètode Split-TEV (Figura 2 C).

Realització de les modificacions efectuades al mètode Split-TEV (Figura 3).

Validació de la interacció de part de les proteïnes control estudiades (Figura 5).



A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells

Xavier Capdevila-Nortes^{a,1}, Tania López-Hernández^{a,1}, Francisco Ciruela^b, Raúl Estévez^{a,c,*}

^aSección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain

^bUnitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain

^cU-750, Centro de Investigación en Red de Enfermedades raras (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 31 January 2012

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)² 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. Immunoprecipitation assays need 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 (R. Estévez).

¹ These authors contributed equally to this work.

² 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_{2A}R, A_{2A} receptor; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; TEVsl, TEV substrate of reduced affinity; CMV, cytomegalovirus; D₂R, dopamine D₂ receptor; TM, transmembrane.

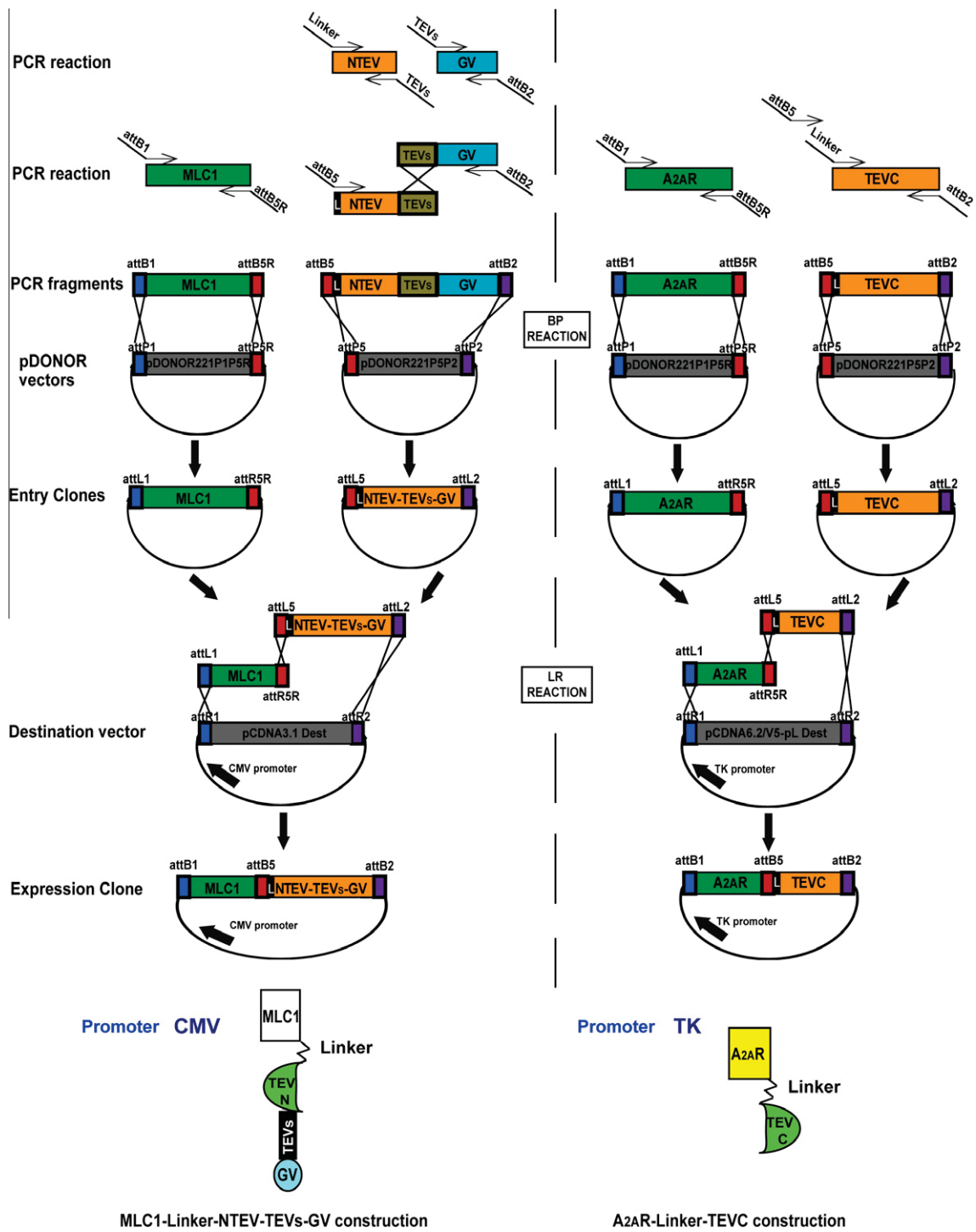


Fig.1. Schematic representation of the cloning procedure of the two fusion proteins used in the final split-TEV method. Primers used are shown in Table 1. BP and LR reactions correspond to the Multisite Gateway System (Invitrogen).

interaction between different membrane proteins, including G protein-coupled receptors (GPCRs) [15] and ion channels.

Materials and methods

Molecular biology

All the expression plasmids were constructed by polymerase chain reaction (PCR) using a polymerase with proofreading activity (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	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGCCACCGAGAAC
attB2 linker GLUC linker	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGTCACCACCGGCC
linker GLUC F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCACCATGAAGCCACCGAGAACAACGAAGAC
linker GLUC R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGTCACCACCGGCCCTTGATCTTGTCAC
attB2 linker GLUC-N linker	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCTATGCCGCCTG
linker GLUC-N F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCTCCGGTAAGCCACCGACTACAACGAAGAC
linker GLUC-N R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGCCTATGCCGCCTGTGGCGACTC
attB1 linker GLUC-C linker	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGAGGCGATCGTC
linker GLUC-C F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCACCATGGAGGCGATCGTCGACATTCCTGAG
<i>Fluorescence complementation method</i>	
attB1 Venus	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGTGGAGCAAGGGC
attB2 Venus	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCAGCC
attB5 Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGACCATGGTGAGCAAGGGC
attB5R Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTTGTACAGCTCGTCCAT
attB5 linker Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGTGGCGGTGGTCCGATCGCA
attB5R linker Venus	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGACCCACCACTCCAGA
linker Venus F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCATGGTGAGCAAGGCCAGGACCTGTTACC
linker Venus R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCTTGTACAGCTCCATGCCAGAGTGAT
attB2 Venus-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGTCGGCGGTGATATA
linker Venus-N R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCGTCGGCGGTGATATAGAGCTGTGGCTGT
attB1 Venus-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGCAGAAGAAC
linker Venus-C F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCAAAGCAGAAGACCGCATCAACCAACTTC
<i>Split-TEV method</i>	
attB1 TEV vector	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCG
attB2 TEV vector	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAATTTCATGAGTTGAGTCCG
linker TEV vector F	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCGCGTATTACAACCC
linker TEV vector R	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCACTTCATGAGTTGAGTCGCTTCCCTAACTGGC
attB2 TEV-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAGTTTGAAGTTGGTTCTCACAAAGAC
linker TEV-N F	GGACCCACCACTCCAGAGCCACCGCCACCACTTGGAAAGTTGGTTGTACAAGACATAT
attB1 TEV-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATCAAGACCATGTCTAGCATGGTGTG
linker TEV-C R	GGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGTCCAAAGCATGTCTAGCATCGTGTGACACACT
attB5 TEVS	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGAAACCTGTACTTCCAAT
attB5R TEVS	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGKATTGGAAGTACAGGTTTTTC
attB5R TEVSla	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGAGTTGGAAGTACAGGTTTTTC
TEVS GV F	GAAAACCTGTACTTCCAATMCATGAAGTACTGTCTTCTATCGAACCAAGCATGC
TEVS GV R	GKATTGGAAGTACAGGTTTTCCACCCTACTCGTCAATTCGAAGGCGATCGG
TEVSla GV F	GAGTTGGAAGTACAGGTTTTCCACCCTACTCGTCAATTCGAAGGCGATCGG
attB1 GV	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGTACTGTCTTCTATCGAACCAAGC
attB2 GV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACCACCGTACTCGTCAATTCGAAG
TEVS F	GAAAACCTGTACTTCCAATCC
TEVS TEV-N F	GAAAACCTGTACTTCCAATCCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCGCG
TEVS TEV-N R	TTGGAAGTACAGGTTTTGAGTTTGGAAAGTTGGTTGTACAAAGACATATGCG
TEVSla TEV-N F	GAAAACCTGTACTTCCAATCCATGGGAGAAAGCTTGTAAAGGGCCGCG
<i>Membrane proteins fused to GV</i>	
attB5 TM	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGATGATGATCAAGCTAGATCAGC
attB2 TM	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAAAACCTATTGTCAATGTCCAAAAC
<i>Membrane proteins tested</i>	
attB1 MLC1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGACCCAGGAGCCAA
attB5R MLC1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTGGGCCATTTGCCACCAC
attB1 A2AR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGCCCCATCATGGGC
attB5R A2AR	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGACACTCCTGCTCCATC
attB1 D2R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGATCCACTGAAT
attB5R D2R	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGCAAGTGGAGGATCTTCAG
attB1 GLIALCAM	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGAAGAGAGAAAGG
attB5R GLIALCAM	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTGGCGCTGATCTCCACCGG
attB1 CIC1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGAGCAATCCCGG
attB5R CIC1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTAAGGATCAGTTCATCCTC
attB1 CIC2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGCGGCCGGAAGCG
attB5R CIC2	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTCTGGCACTTGTCACTC
attB1 GLT1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGCATCAACCCAGGGTGGC
attB5R GLT1	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTGTTTTTTCACGTTTCCAAGG

The integrity of all cloned constructs was confirmed by DNA sequencing. All PCA fragments were fused to the protein of interest with a linker consisting in the amino acid sequence GGGGSGGGGS. A schematic representation of the design of two fusion constructs used in the final split-TEV assay is shown in Fig. 1. Primers used in the construction of the different plasmids are indicated in Table 1.

Cell culture and transfection

HeLa cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 100 mg/ml penicillin, and 5% (v/v) fetal bovine serum. The cells were seeded on plates and were

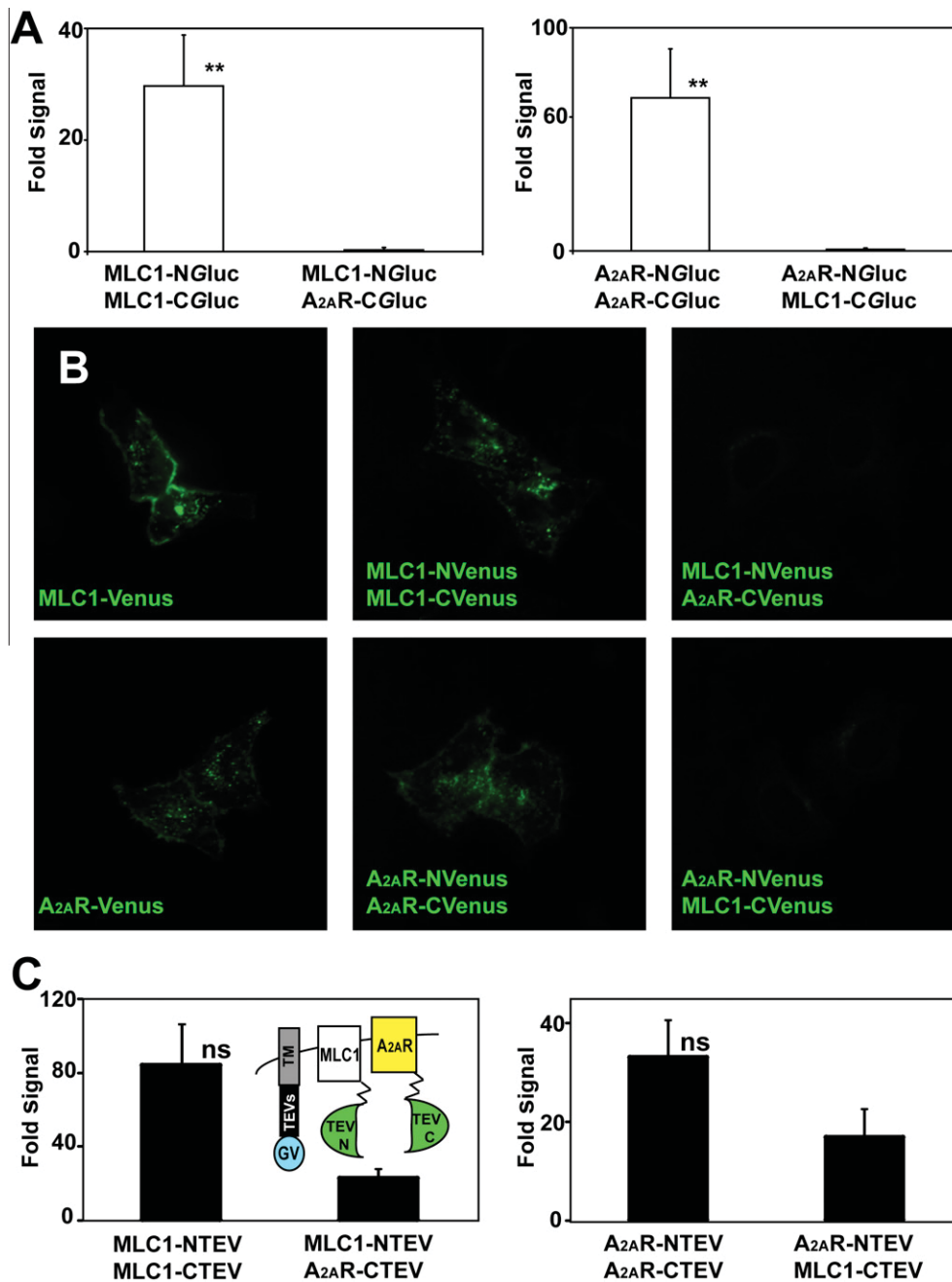


Fig.2. Comparison among different PCA methods (*Gluc*, BiFC, and the reported split-TEV assay) on the interactions of two unrelated membrane proteins. (A) HeLa cells expressing MLC1 and A₂AR fused to the indicated *Gluc* PCA fragments were studied by luminometric analysis in live cells. Fold signal was 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 A₂AR 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 A₂AR 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.

transiently transfected with the corresponding complementary DNA (cDNA) constructs using Transfectin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Bimolecular fluorescence complementation

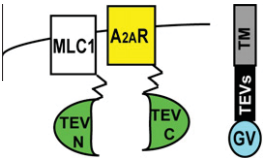
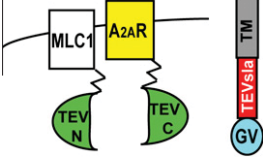
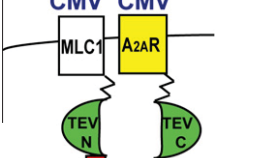
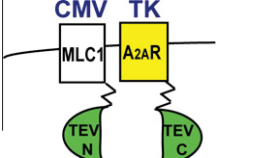
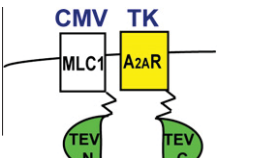
Plasmids containing the yellow fluorescent protein variant Venus PCA fragments (N or C terminus) were constructed as described previously [16] and cotransfected in HeLa cells in a 1:1

ratio. After 48 h, cells were visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal microscope (Barcelona, Spain).

Gaussia luciferase complementation

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- β Gal vector at 1:10, which was used to monitor the transfection effi-

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 _{2A} R Fold)	<i>n</i>
	MLC1–MLC1	13704 ± 7380	84.5 ± 26.3	3.4 ± 1.2	5
	MLC1–A _{2A} R	2759 ± 875	30.1 ± 8.1		
	Background	134 ± 58			
	MLC1–MLC1	449 ± 197	41.3 ± 12	4.8 ± 1.2	5
	MLC1–A _{2A} R	80 ± 22	8.1 ± 1.8		
	Background	13 ± 7			
	MLC1–MLC1	1176 ± 322	389 ± 88	3.1 ± 0.8	6
	MLC1–A _{2A} R	422 ± 119	138 ± 36		
	Background	4 ± 1			
	MLC1–MLC1	104 ± 68	6.3 ± 1.2	11.2 ± 3.0	11
	MLC1–A _{2A} 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 _{2A} 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 β -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_{2A}R). The last column shows the number of independent experiments performed (*n*). Values correspond to means \pm standard errors.

ciency. Next, 24 h after transfection, cells were trypsinized and plated in 35-mm dishes. Another 24 h later, medium was exchanged by phosphate-buffered saline (PBS). Native coelenterazine (Nanolight Technology) was reconstituted as a stock solution of 1 mg/ml in methanol and diluted in PBS at a final concentration of 20 μ M. Medium was exchanged and immediately measured in a TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems, Madison, WI, USA). After measurement, to normalize the data, cells were solubilized and 30 μ l of the cell lysates was used to measure the β -galactosidase enzyme activity using a Luminiscent β -Galactosidase Detection Kit II (Clontech, Nucliber, Spain) in the same luminometer.

Split-TEV final method

The final modification of the split-TEV method was performed as detailed below. 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 [18]. The oligopeptide substrate used as the TEV protease recognition site was ENLYFQS (TEVs). The chimeric transcription factor used was GV (obtained from the pM3-VP16 vector, Clontech), which contains the yeast Gal4DNA binding domain and the herpes simplex VP16 transactivation domain. In cases where the TEV affinity for its substrate was reduced, we used

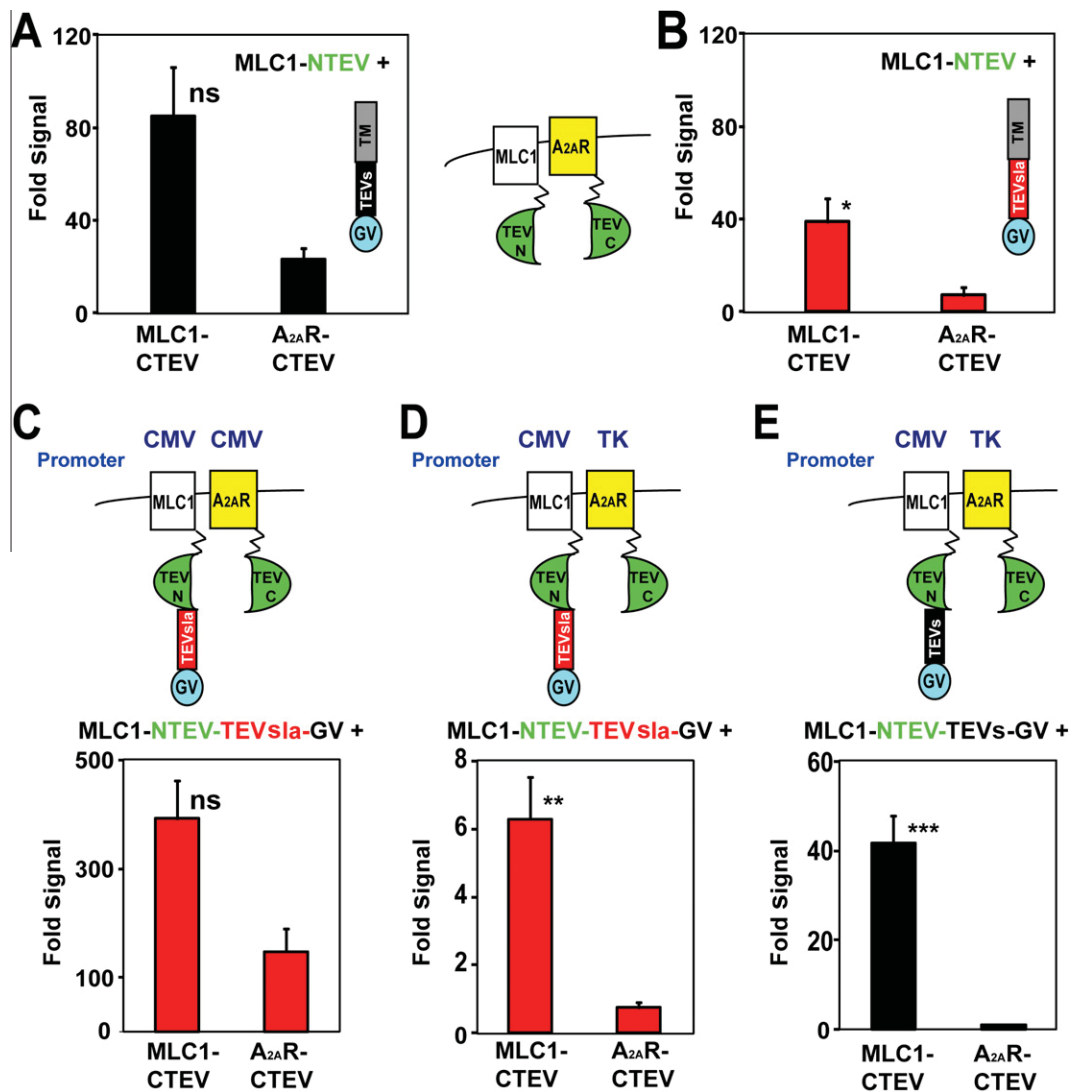


Fig. 3. Development of a new variant of the split-TEV method. (A, B) Reduction in the affinity between TEV and its recognition site. HeLa cells expressing the indicated fusion proteins (shown schematically in the middle panel: MLC1-TEVN, A_{2A}R-TEVC) together with a transmembrane (TM) protein containing either the classical TEVs (A) or the low-affinity TEVs (TEVsla) (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 (TEVsla). 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 μ g with the following ratios: 0.75 μ g of each protein containing the TEV-N and TEV-C fragments, 0.3 μ g of the reporter plasmid pNEBr-X1Gluc, and 0.2 μ g of the pCMV- β Gal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 h, 20 μ l 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 μ M 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 \pm 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.

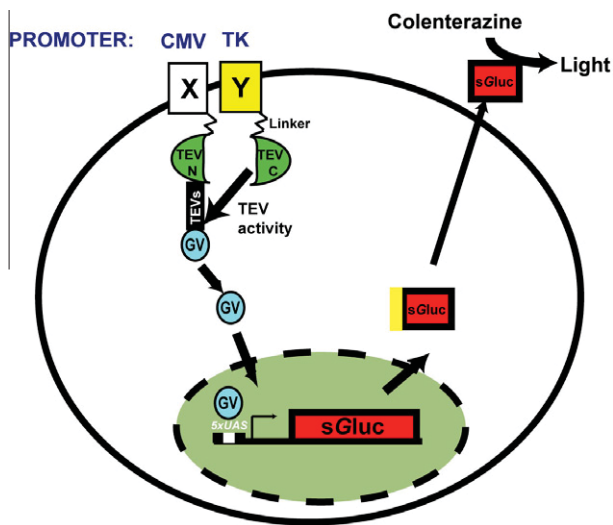


Fig. 4. Schematic representation of the final split-TEV method developed. Cells expressed a fusion of one protein of interest (X, in white) by a flexible linker to the TEV N-terminal PCA fragment, the TEV recognition site of normal affinity, and the transcription factor GV, under the control of a CMV 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_{2A} receptor ($A_{2A}R$) [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 $A_{2A}R$ 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 $A_{2A}R$, 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– $A_{2A}R$ 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_2 receptor (D_2R) (Fig. 5A). As described previously [20], D_2R homo-oligomerization and hetero-oligomerization with $A_{2A}R$ were detected, whereas no interaction was observed between D_2R and MLC1. Similar results were observed in Gluc PCA assays, although the hetero-oligomerization with $A_{2A}R$ was not statistically significant (Fig. 6A).

We also studied ion channels, addressing Cl^- channels from the CLC family [23], which X-ray structures have proved that are able to homo-oligomerize. 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 $A_{2A}R$, 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 $A_{2A}R$ (Fig. 5D).

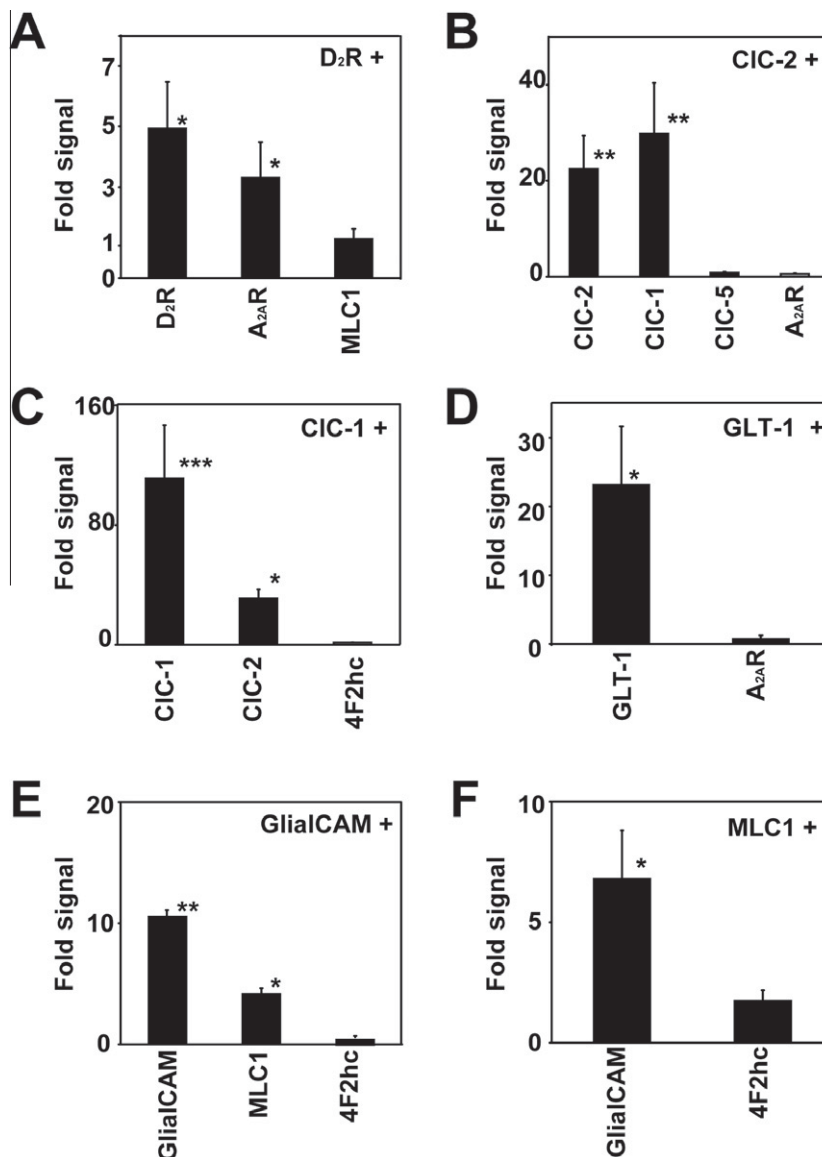


Fig. 5. Application of the new split-TEV assay to detect interactions between different types of membrane proteins. The membrane proteins studied were D₂R as a GPCR (A), CIC-2 and CIC-1 as ion channels (B, C), GLT-1 as a transporter (D), and GlialCAM and MLC1 as cell adhesion molecules (E, F). HeLa cells 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

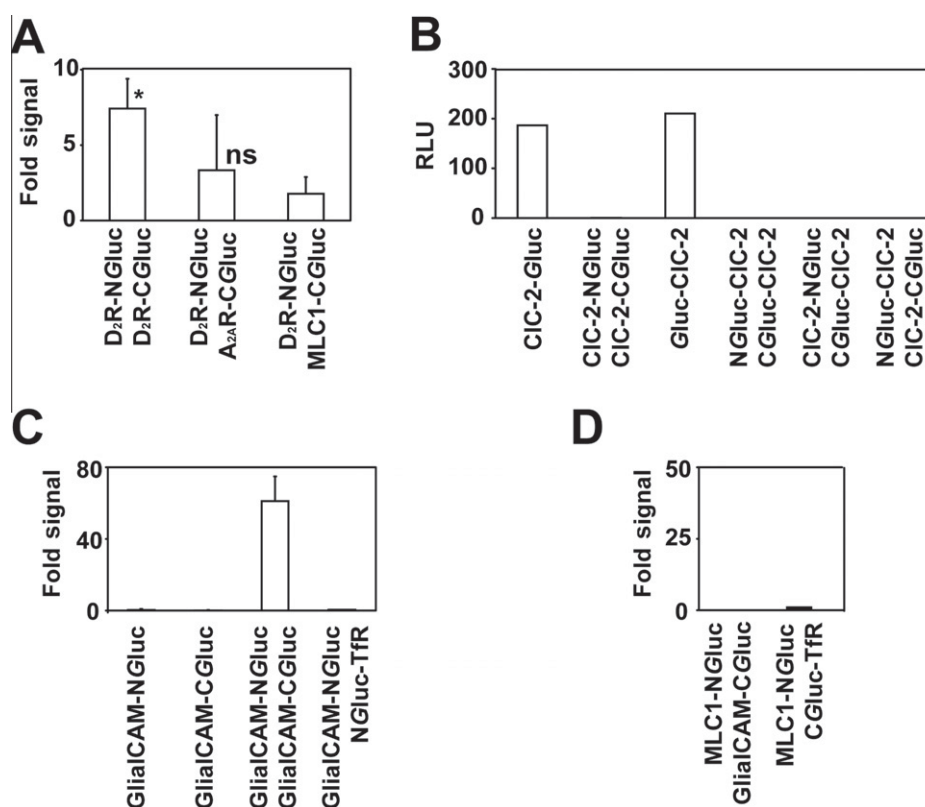


Fig. 6. Gluc PCAs for some membrane proteins that were also studied by split TEV. The membrane proteins studied were the GPCR dopamine D₂ receptor (D₂R) (A), the chloride channel CIC-2 (B), and the cell adhesion molecules GlialCAM and MLC1 (C, D). HeLa cells expressing the indicated proteins fused to 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⁻ 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. Filipek, 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. Rosner, 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. Rosner, 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. Rosner, 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 *Gaussia* 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⁻ 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 *Gaussia* 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.

GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves as a CIC-2 Cl⁻ Channel Auxiliary Subunit

Article publicat el març del 2012 a la revista Neuron.

Contribució:

Construcció dels constructes necessaris per realitzar els assajos d'interacció per Split-TEV.

Estudis d'interacció entre DmCIC-2 i GlialCAM i entre CIC-2 i HepaCAM2 (Figura 5 B i D).

Construcció dels mutants de GlialCAM.

Estudis d'interacció i localització del Δ N CIC-2 amb GlialCAM (Figura suplementària 5 A i B).

GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves as a CIC-2 Cl⁻ Channel Auxiliary Subunit

Elena Jeworutzki,^{1,11} Tania López-Hernández,^{2,11} Xavier Capdevila-Nortes,² Sònia Sirisi,^{2,5} Luiza Bengtsson,⁴ Marisol Montolio,^{2,6} Giovanni Zifarelli,¹ Tanit Arnedo,² Catrin S. Müller,⁸ Uwe Schulte,⁸ Virginia Nunes,^{3,5,7} Albert Martínez,⁹ Thomas J. Jentsch,⁴ Xavier Gasull,¹⁰ Michael Pusch,^{1,11} and Raúl Estévez^{2,6,11,*}

¹Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 16149 Genoa, Italy

²Physiology section

³Genetic section

Department Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain

⁴Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) and Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), D-13125 Berlin, Germany

⁵Laboratorio de Genética Molecular-IDIBELL

⁶U-750, Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII

⁷U-730, Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII

⁸Logopharm GmbH, D-79232 March-Buchheim, Germany

⁹Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

¹⁰Laboratory Neurophysiology, Department Physiological Sciences I, School of Medicine, University of Barcelona-IDIBAPS, 08007, Spain

¹¹These authors contributed equally to this work

*Correspondence: 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⁻ 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 anterior 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 (Teijido 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⁻ 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*^{-/-} 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

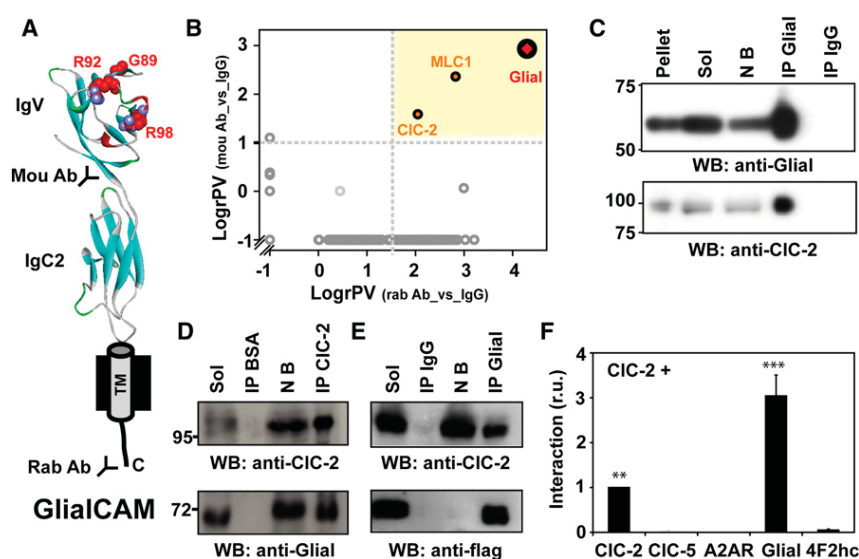


Figure 1. Identification of CIC-2 as a GlialCAM-Interacting Protein

(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 spectrometry 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 $2Cl^-/H^+$ 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

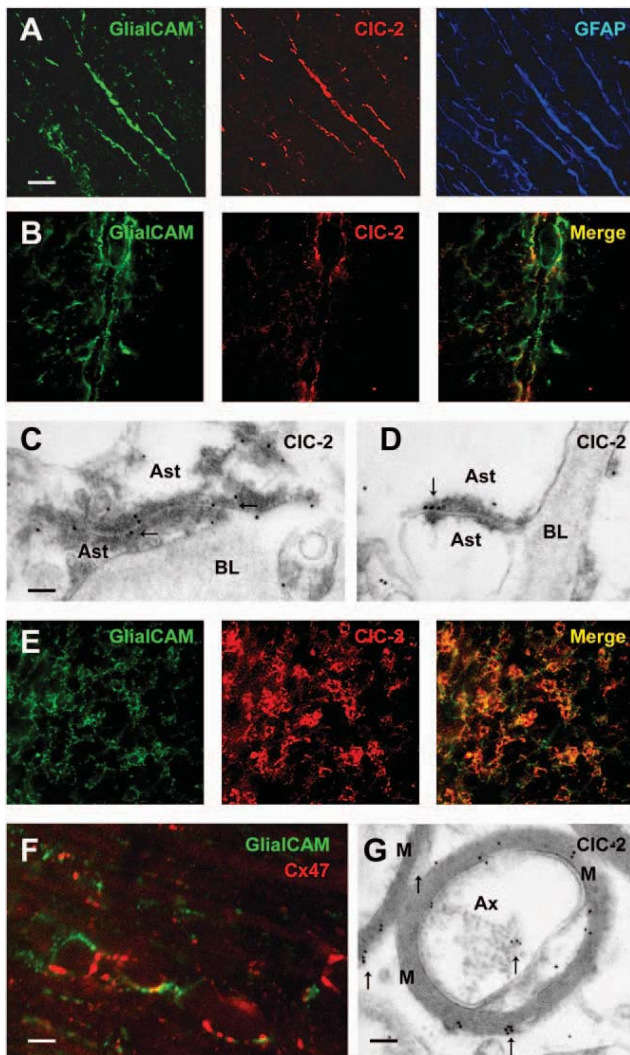


Figure 2. Localization of CIC-2 and GlialCAM in the Brain

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 μ m; (F) 5 μ 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-Konkola 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*^{-/-} 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*^{-/-} 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 changes 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 asked 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

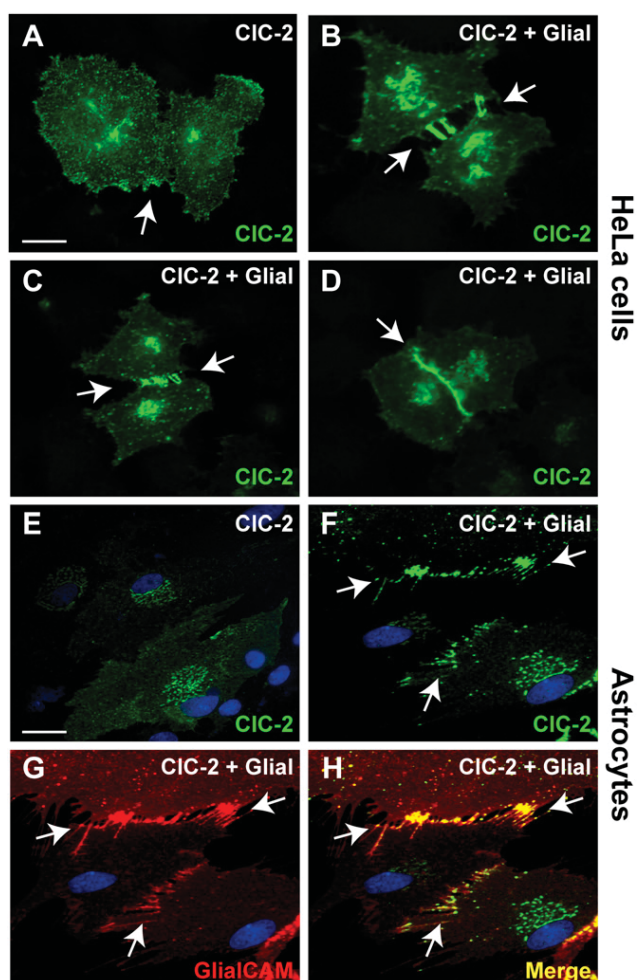


Figure 3. GlialCAM Changes the Subcellular Distribution of CIC-2 in HeLa Cells and in Primary Cultures of Astrocytes

(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 μ 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 μ 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 4F).

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 (Δ 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 Δ N mutant to cell-cell contacts (Figure S5B) just like wild-type CIC-2. Moreover, GlialCAM potentiated Δ N currents in transfected HEK293 cells (Figure S5C).

We then compared the functional properties of CIC-2, Δ N and GlialCAM/CIC-2. Hypo-osmolarity increased currents of GlialCAM/CIC-2 and CIC-2, but had no effect on Δ 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 ± 0.4 pS ($n = 8$), a value very similar to what has been previously reported (Weinreich and Jentsch,

Neuron

A Subunit of CIC-2 Defective in a Leukodystrophy

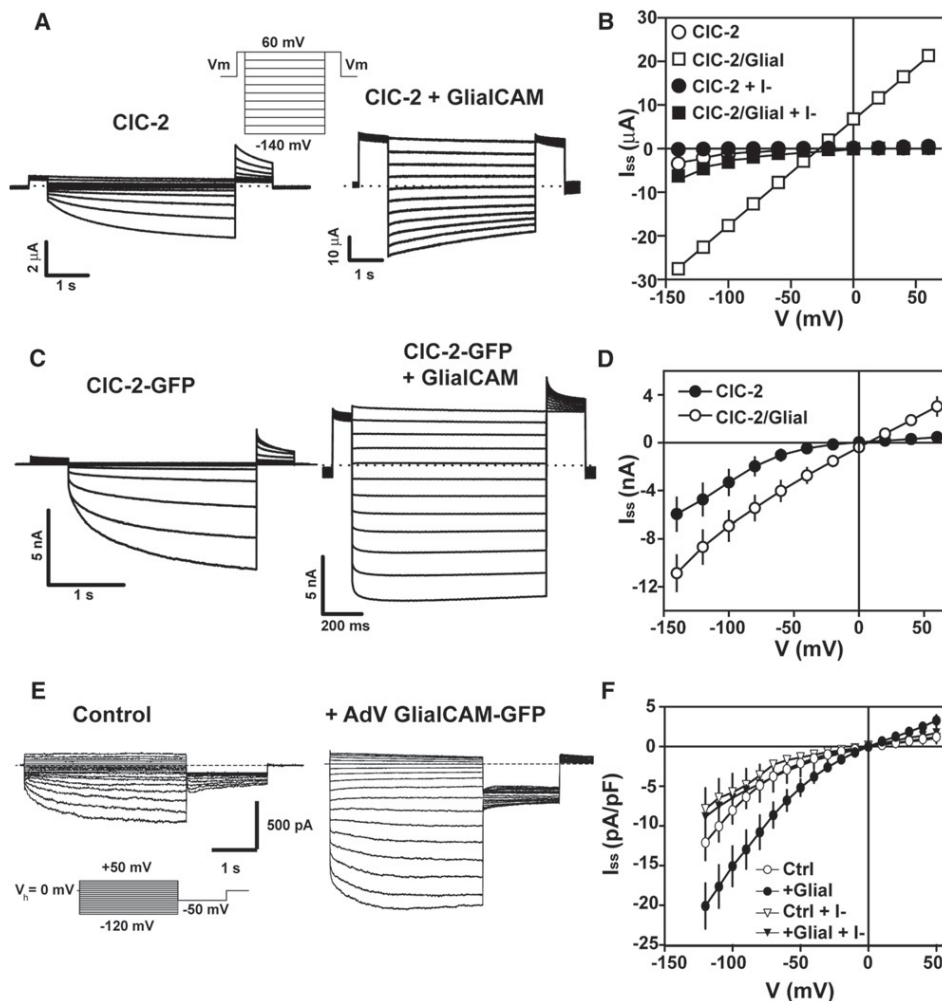


Figure 4. GlialCAM Modifies CIC-2 Currents in *Xenopus* Oocytes, HEK Cells, and Primary Rat Astrocytes

(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 ΔN (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 cytoplasmic 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

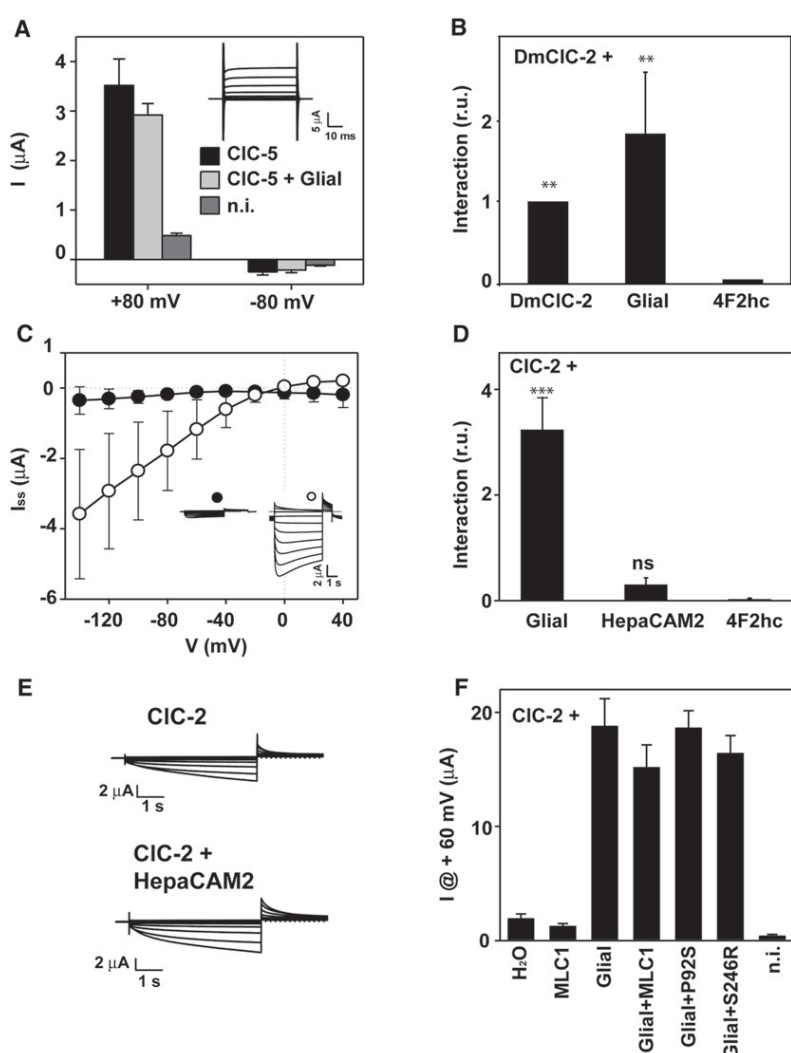


Figure 5. Specificity of the CIC-2 GlialCAM Interaction

(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

Neuron

A Subunit of CIC-2 Defective in a Leukodystrophy

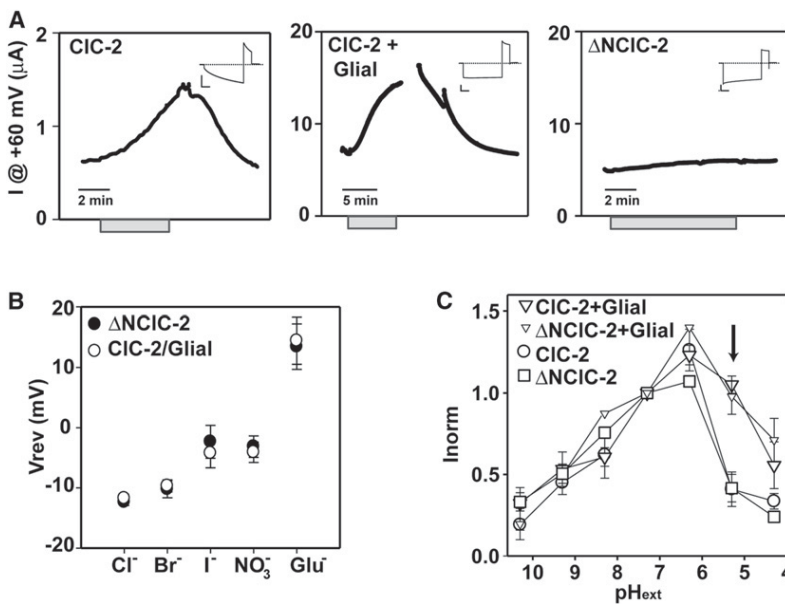


Figure 6. Electrophysiological Characterization of the GlialCAM/CIC-2 Complex

(A) Dependence on the extracellular osmolarity of CIC-2, CIC-2 + GlialCAM, or $\Delta\text{NCIC-2}$ 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 $\Delta\text{NCIC-2}$ ($n = 5 \pm \text{SEM}$) and CIC-2/GlialCAM ($n = 5 \pm \text{SEM}$) currents under different anionic conditions.

(C) pH dependence of CIC-2 and $\Delta\text{NCIC-2}$, 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.

large electrochemical 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

et al., 2011). Furthermore, MLC1 expression and localization is unaltered in *Cicn2*^{-/-} 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) fails 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

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*^{-/-} 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⁺ 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*^{-/-} 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,

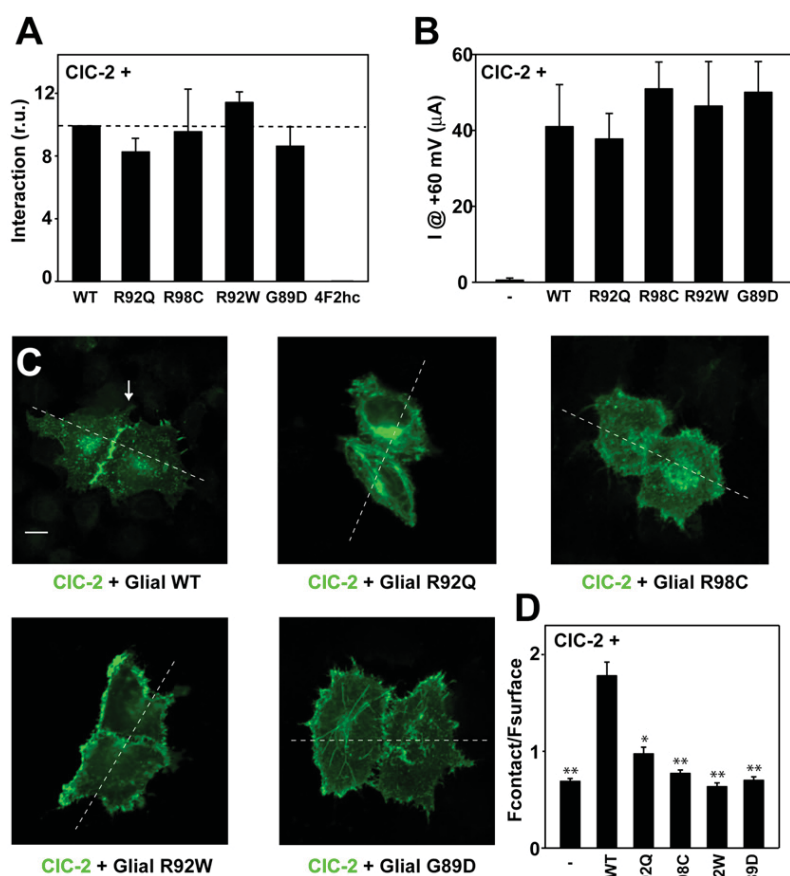


Figure 7. Biochemical and Functional Consequences of *GLIALCAM* Mutations on CIC-2

(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 μm . 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 ± 0.03 ($n = 58$), CIC-2 + GlialCAM a value of 1.8 ± 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 seems possible that GlialCAM may organize 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^- 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 accumulation of osmotically driven water, lead to the vacuolization observed in MLC patients with mutations in *GLIALCAM* or in *Clcn2*^{-/-} 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; Scheper et al., 2010) might be explained by the presence of additional symptoms (e.g., blindness, male infertility, as expected from the phenotype of *Clcn2*^{-/-} 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 β -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

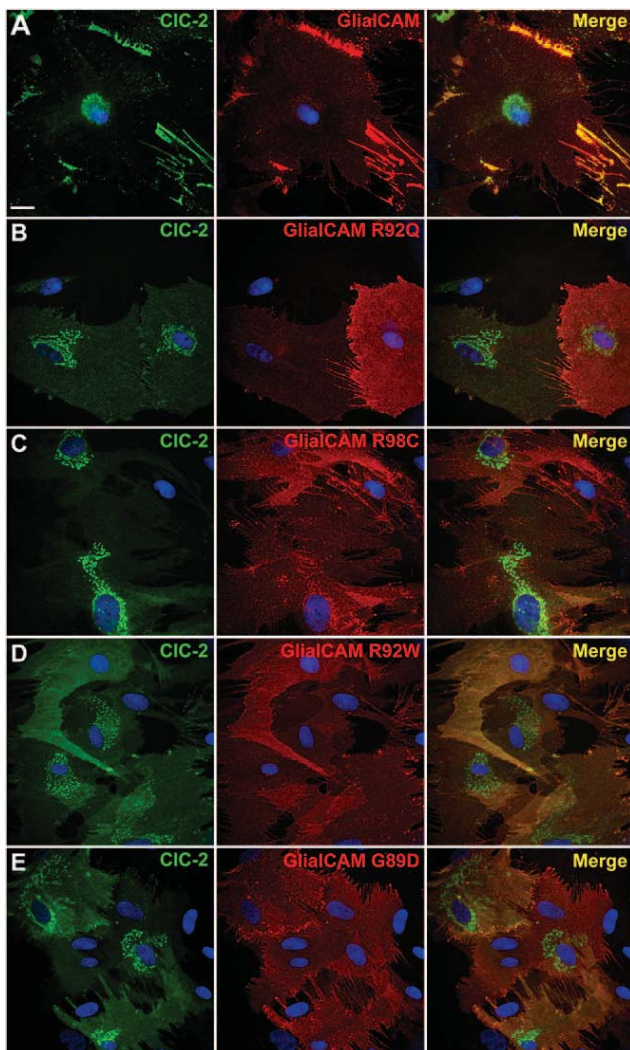


Figure 8. CIC-2 and GlialCAM Subcellular Localization Changes Caused by *GLIALCAM* Mutations in Primary Cultures of Astrocytes (A–E) Astrocytes were cotransduced with adenoviruses expressing CIC-2 together with wild-type GlialCAM (A) or containing the MLC-related mutations R92Q (B), R98C (C), R92W (D), 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 μm .

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 μg 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 (Δ 16–61) mutant Δ 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 Δ 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- Δ 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 Δ 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_4 , 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^- 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 Δ N-GFP with or without GlialCAM, were measured with an extracellular solution containing (in mM): 140 NaCl, 2 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , and 10 HEPES/NaOH (pH 7.3) using standard patch-clamp technique. Intracellular solution was (in mM) 130 NaCl, 2 MgSO_4 , 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 μ 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*^{-/-} mice.

Primary Culture and Adenoviral Transduction

Rat primary quiescent astrocyte cultures were prepared as described previously (Duarrí et al., 2008). Dibutyl-*c*-AMP 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 Δ CIC-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, Δ CIC-2, GlialCAM wild-type, HepaCAM2, GlialCAM Δ 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 Destr, 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 μ g, with the following ratios: 0.75 μ g of each protein containing the TEV-N and the TEV-C fragments, 0.3 μ g of the reporter gene pNEBr-X1GLuc, and 0.2 μ g of the pCMV- β Gal vector, which was used to monitor the transfection efficiency. After 48 hr, 20 μ 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 μ M of native colenterazine. To normalize the data, cells were solubilized and 30 μ l of the cell lysates were used to measure the β -Galactosidase enzyme activity using the Luminiscent β -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 2009 SGR869 (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). This work is dedicated to the memory of Günter Jeworutzki.

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⁻ 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.
- Duarrí, 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.

Neuron

A Subunit of ClC-2 Defective in a Leukodystrophy

- 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⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ 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⁻ channels. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 149–156.
- Földy, C., Lee, S.H., Morgan, R.J., and Soltesz, I. (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel ClC-2. *Nat. Neurosci.* **13**, 1047–1049.
- 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⁻ 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., Palacián, 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.
- Thieman, 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.

Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents

Article publicat el juny del 2013 a la revista Human Molecular Genetics.

Contribució:

Generació, desenvolupament i caracterització del model astrocitari *knock-down* de GlialCAM (Figures 1 i 2 i figures suplementàries 1 i 2).

Generació i caracterització dels models de complementació del model *knock-down* de GlialCAM (Figura 5 i figura suplementària 5).

Estudis fenotípics i caracterització de la vacuolització dels models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM i els respectius models de complementació (Figures 7 i 8 A-B i figura suplementària 4).

Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents

Xavier Capdevila-Nortes¹, Tania López-Hernández^{1,7}, Pirjo M. Apaja^{3,4}, Miguel López de Heredia^{5,6}, Sònia Sirisi^{1,5}, Gerard Callejo^{8,9}, Tanit Arnedo^{1,7}, Virginia Nunes^{2,5,6}, Gergely L. Lukacs^{3,4}, Xavier Gasull^{8,9} and Raúl Estévez^{1,7,*}

¹Sección de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas II and ²Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ³Department of Physiology and ⁴Research Group Focused on Protein Structure, McGill University, Montréal, Quebec, Canada H3E 1Y6, ⁵Laboratorio de Genética Molecular, IDIBELL, Barcelona, Spain, ⁶U-730 and ⁷U-750, Centro de Investigación en red de enfermedades raras (CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain, ⁸Neurophysiology Lab, Department Physiological Sciences I, Medical School, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ⁹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Received May 11, 2013; Revised and Accepted June 18, 2013

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy caused by mutations in either *MLC1* or *GLIALCAM* genes and is associated with myelin and astrocyte vacuolation. It has been suggested that MLC is caused by impaired cell volume regulation as a result of defective activation of astrocytic volume-regulated anion currents (VRAC). GlialCAM brings MLC1 and the CIC-2 Cl⁻ channel to cell–cell junctions, even though the role of CIC-2 in MLC disease remains incompletely understood. To gain insights into the biological role of GlialCAM in the pathogenesis of MLC disease, here we analyzed the gain- and loss-of-function phenotypes of GlialCAM in HeLa cells and primary astrocytes, focusing on its interaction with the MLC1 protein. Unexpectedly, GlialCAM ablation provoked intracellular accumulation and reduced expression of MLC1 at the plasma membrane. Conversely, over-expression of GlialCAM increased the cellular stability of mutant MLC1 variants. Reduction in GlialCAM expression resulted in defective activation of VRAC and augmented vacuolation, phenocopying MLC1 mutations. Importantly, over-expression of GlialCAM together with MLC1 containing MLC-related mutations was able to reactivate VRAC currents and to reverse the vacuolation caused in the presence of mutant MLC1. These results indicate a previously unrecognized role of GlialCAM in facilitating the biosynthetic maturation and cell surface expression of MLC1, and suggest that pharmacological strategies aimed to increase surface expression of MLC1 and/or VRAC activity may be beneficial for MLC patients.

INTRODUCTION

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy (genetic alteration of the white matter) that affects brain chloride and fluid homeostasis (1). MRI of patients shows diffuse signal abnormality, swelling of the cerebral white matter and the presence of subcortical cysts, mainly in the anterior temporal regions (2,3). Studies from an MLC patient brain biopsy revealed that the major phenotype

of the disease was myelin vacuolation (4). These results, together with proton magnetic spectroscopic resonance data (5,6), suggested that MLC is caused by disturbed fluid homeostasis.

MLC1 was the first gene to be identified in MLC patients (7) and accounts for MLC in most patients. In mouse and human tissue, high MLC1 levels were present in astroglial–astroglial junctions and ependymal cells in blood–brain and CSF–brain barriers, apart from astrocytic junctions of Bergmann glia in the cerebellum (8–11). Thus, it has been proposed that MLC

*To whom correspondence should be addressed at: Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, C/Feixa Llarga s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34 934039781; Fax: +34 934024268; Email: restevez@ub.edu

has an astrocytic origin (12), based on the fact that MLC1 is mostly expressed in astrocytes. In agreement with this hypothesis, depletion of MLC1 in astrocytes causes vacuolation, a phenotype that was also observed after re-examination of a MLC patient's brain biopsy (13), which showed previously only myelin vacuoles. Interestingly, reduction in MLC1 in astrocytes and in lymphoblast cell lines from MLC patients was found to be associated with a reduced activity of volume-regulated anion currents (VRAC) by an unknown mechanism (14). In parallel, the rate of regulatory volume decrease after cell swelling was reduced in MLC1-depleted cells (14). It has also been suggested that MLC1 could interact functionally with the β -subunit of the Na^+/K^+ ATPase (15) and with the TRPV4 ion channel (16). However, the role of MLC1 is still completely unknown, and whether these interactions are related to the effects of MLC1 depletion on VRAC activity is unknown.

GLIALCAM was recently identified as a second gene mutated in MLC (17). It was demonstrated that GlialCAM functions as an escort molecule necessary to target MLC1 to cell–cell junctions (18). Moreover, the changed localization of the MLC1/GlialCAM complexes seems to play an important role in the development of the disease, as most *GLIALCAM* mutations impair the correct trafficking of GlialCAM and MLC1 to astrocyte–astrocyte junctions (17,18).

Histological studies in tissue indicated that GlialCAM is mostly localized in astrocyte–astrocyte junctions where it co-localizes with MLC1 (17), but also in oligodendrocyte processes (19,20). Proteomic studies searching for additional GlialCAM protein partners revealed that GlialCAM also acts as an auxiliary subunit of the CIC-2 chloride channel, targeting it to astrocytic cell junctions and modifying its functional properties (20). Similar to its effect on MLC1 targeting, *GLIALCAM* MLC-related mutations also impair the trafficking of CIC-2 to cell junctions. Strikingly, *Clcn2* KO mice also displayed similar vacuolation to what is seen in MLC patients (21), suggesting its involvement in the pathogenesis of MLC. However, no *CLCN2* mutations were detected in MLC patients (22) and no direct protein interaction was found between MLC1 and CIC-2 (13,20). Thus, the involvement of CIC-2 in MLC disease is unclear. However, very recently, it has been shown that *CLCN2* mutations may cause certain forms of a human leukodystrophy characterized by white matter oedema (23).

Dominant mutations in *GLIALCAM* cause other type of disease called MLC2B characterized by transient features of MLC (24). Similar to the recessive *GLIALCAM* mutations, also dominant mutations cause MLC1 and CIC-2 trafficking defects (17,18,20). It is still unknown why dominant mutations and not recessive mutations show a trafficking dominant behavior. Furthermore, dominant mutations are also associated with different clinical phenotypes than MLC1 mutations, while the clinical and MRI phenotypes related to recessive *MLC1* and *GLIALCAM* mutations are the same.

In the present work, we have analyzed biochemically and functionally what the consequences of a reduced GlialCAM expression are, and compared them with the effects of a reduced MLC1 expression. The effect of *GLIALCAM* and *MLC1* mutations was also addressed. The results obtained indicate that GlialCAM is necessary for MLC1 protein expression, and its reduction affects the activity of VRAC, which may cause astrocyte vacuolation. Thus, this work extends the role of GlialCAM

as a chaperone of MLC1 needed for proper VRAC activation. In addition, based on functional data obtained, we suggest that a therapeutic strategy aimed to recover the surface expression of MLC1 and/or the activation of VRAC currents can be envisaged as beneficial for all MLC patients.

RESULTS

Experimental approach to create an astrocyte cell model with reduced GlialCAM expression

To study the cellular effects of GlialCAM ablation, adenoviral vectors expressing two distinct shRNA (1 or 2) against rat GlialCAM with the fluorescent protein EmGFP, allowing visualization of transduced cells, were produced. An adenoviral vector expressing non-targeted or scrambled shRNA (SCR) was used as a control. RT-qPCR experiments performed 7 days after GlialCAM shRNA infection of astrocytes demonstrated that endogenous GlialCAM mRNA levels were profoundly depleted (Fig. 1A). Accordingly, western blot (WB) analysis indicated that the GlialCAM protein level was reduced by 80% when compared with the control SCR (Fig. 1B and Supplementary Material, Fig. S1). Immunofluorescence experiments confirmed no detectable GlialCAM protein in shRNA-treated cells (Fig. 1C). Both types of experiments (WB and immunofluorescence) also demonstrated the specificity of the GlialCAM antibodies used (17). As an additional control, to exclude side effects of shRNAs, we also complemented with an adenovector expressing human C-terminally flag-tagged GlialCAM, which was resistant to the rat-specific GlialCAM shRNAs (Fig. 1B and C).

Reduction in GlialCAM expression led to intracellular retention and reduced expression of MLC1 in rat astrocytes

We studied the consequences of reduced GlialCAM expression at the mRNA, protein and subcellular localization of MLC1 (Fig. 2). As a specificity control, we monitored the expression and subcellular localization of a subset of proteins associated with tight, adherent and gap junctions. Knockdown of GlialCAM led to a reduction (about 30%) of the *MLC1* mRNA levels (not significant) (Fig. 2A). However, the MLC1 protein abundance was reduced to 60% of wild-type values (Fig. 2B and Supplementary Material, Fig. S1), which cannot be explained by the reduction in the mRNA levels. Protein levels of some junction proteins were not altered, excluding non-specific effects (Fig. 2B and data not shown).

Importantly, while MLC1 was predominantly confined to an intracellular perinuclear compartment (Fig. 2D, arrowheads) in astrocyte depleted of GlialCAM, MLC1 remained associated with cell–cell junctions in astrocytes transduced with control shRNA (Fig. 2C). Furthermore, the junctional localization of MLC1 was recovered after complementation of the astrocytes with flag-tagged human GlialCAM cDNA (Fig. 2E), which was resistant to this shRNA (Fig. 1 and Supplementary Material, Fig. S1). Therefore, altered processing and decreased stability of the MLC1 may account for the cellular phenotype of MLC1 rather than non-specific effects of the shRNA. Additional control experiments also showed that localization of some junction proteins was not changed in GlialCAM-depleted astrocytes (Supplementary Material, Fig. S2 and data not shown).

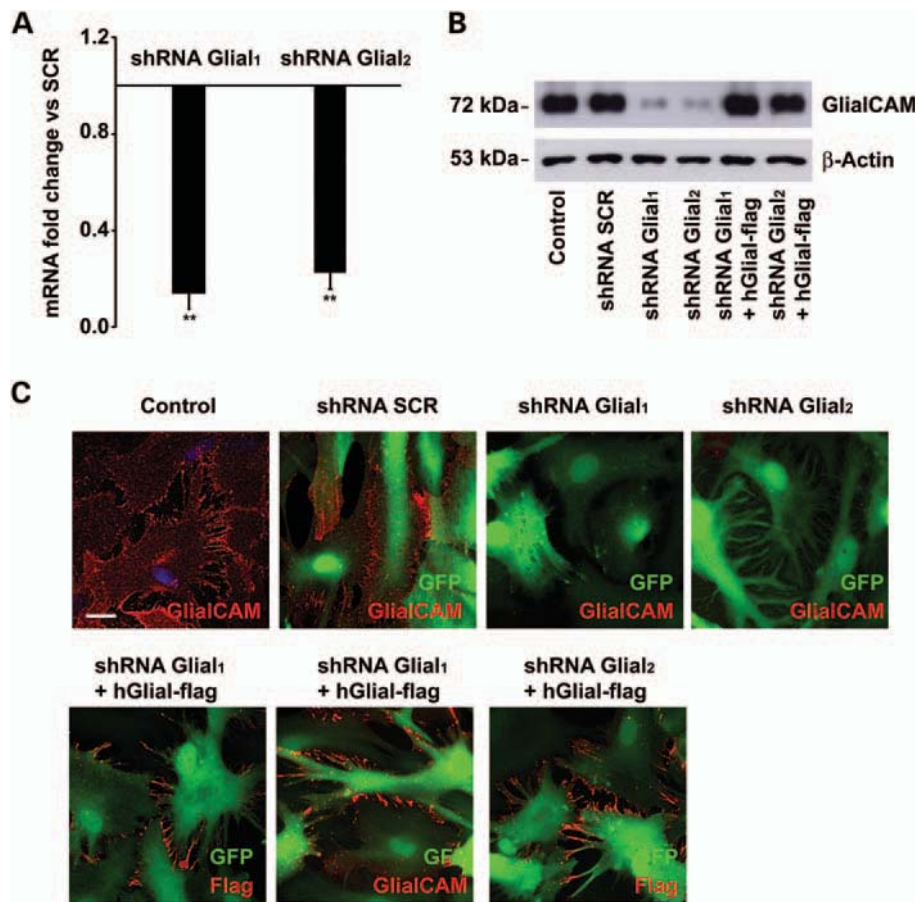


Figure 1. Adenovector-mediated knockdown of GlialCAM in primary astrocytes. (A) RT-qPCR experiments using specific primers to detect rat *GLIALCAM* mRNA. Data represent the ratio of mRNA fold change versus the SCR control (mean \pm SEM) of at least four different astrocyte preparations either treated at MOI 10 with SCR (scrambled) or with 2 different shRNAs against *GLIALCAM*. Both shRNA Glial1 and Glial2 (see Materials and Methods) caused almost complete inhibition of mRNA expression. $**P < 0.01$ (B) Astrocytes (untreated or transduced at MOI 10 with the shRNA indicated during 7 days, or complemented with adenovirus expressing flag-tagged human GlialCAM at MOI 2 during 2 days) were analyzed by WB using antibodies against GlialCAM. The GlialCAM antibodies used were able to detect the rat and human GlialCAM proteins. β -Actin was used as a loading control. Other different experiments gave similar results ($n = 5$). (C) Control or astrocytes transduced with the adenovirus indicated were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies against GlialCAM. Transduced cells were visualized by the positive GFP signal. GlialCAM signal in astrocyte–astrocyte processes was detected in control cells and in cells transduced with the SCR shRNA but not in cells transduced with the shRNA1 against GlialCAM. In the panels below, cells were co-transduced with an shRNA against GlialCAM and flag-tagged human GlialCAM (resistant to shRNA) and immunofluorescence was performed using antibodies against the flag epitope or GlialCAM. Scale bar: 20 μ m.

GlialCAM improves the protein stability and surface expression of MLC1 variants containing MLC-related mutations

The above results suggest that GlialCAM may function as a chaperone needed for correct MLC1 folding and expression. If this is the case, GlialCAM over-expression may correct the localization of MLC1 variants containing MLC-related mutations, which primarily affect MLC1 protein folding (25). To test this hypothesis, we constructed adenoviruses expressing a HA-tagged human MLC1 variant containing the MLC-related mutations Pro92Ser (P92S) or Ser246Arg (S246R), and they were used to transduce rat astrocytes with or without GlialCAM. The immunostaining of the mutant MLC1-P92S showed a perinuclear intracellular distribution in astrocytes (Fig. 3A), similar to the endoplasmic reticulum (ER) (25). However, co-expression with GlialCAM led to a re-distribution of the

P92S variant to astrocyte–astrocyte junctions (Fig. 3B left, arrowheads), co-localizing with GlialCAM (Fig. 3B, right, arrowheads). Similar results were obtained with the MLC1-S246R mutant (Supplementary Material, Fig. S3A). We next asked whether MLC1 intracellular retention could be attenuated in HeLa cells expressed heterologously. GlialCAM was indeed able to rescue the intracellular accumulation of all MLC1 mutants studied (G59E, C85W, L311Ins and N141K) and relocate them to the cell junction [Supplementary Material, Fig. S3B–E and (18)].

Using a chemiluminescence-based cell surface ELISA assay, the MLC1 cell surface density was determined as a function of GlialCAM expression, taking advantage of the extracellular HA epitope. The MLC1-P92S has an 80% reduced cell surface expression relative to its wild-type counterpart (Fig. 3C). GlialCAM over-expression increased the relative surface-expression levels of the MLC1-P92S in rat astrocytes (Fig. 3D). The

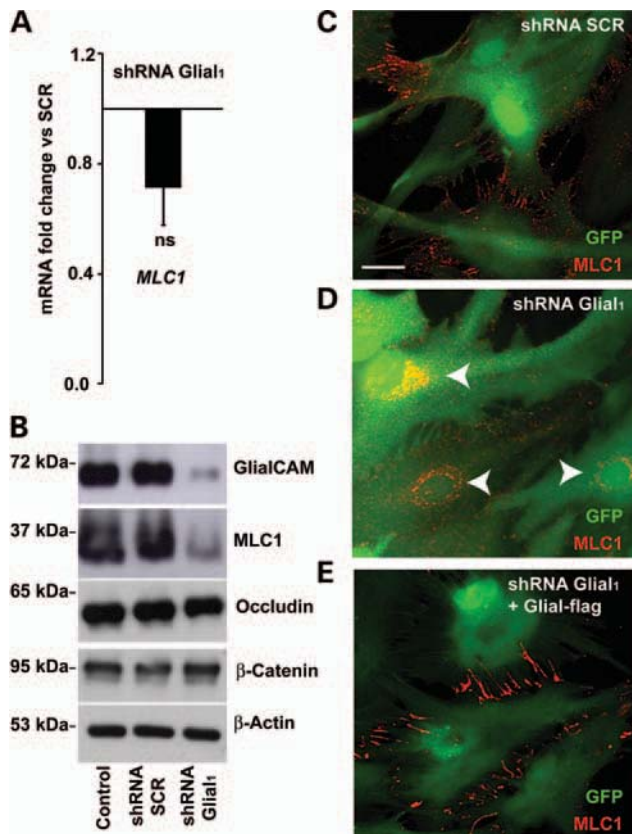


Figure 2. Expression of MLC1 in GlialCAM-depleted astrocytes. (A) RT-qPCR experiments using specific primers to detect rat *MLC1* mRNA. Data represent the mean \pm SEM of four different astrocyte preparations either treated at MOI 10 with SCR (scrambled) or with a shRNAs against GlialCAM. Both shRNA Glial1 and Glial2 gave similar results. Ns, not significant; * $P < 0.01$. (B) Astrocytes (untreated or transfected at MOI 10 with the shRNA indicated during 7 days) were analyzed by WB using antibodies against the indicated proteins. β -Actin was used as a loading control. Different experiments gave similar results ($n = 3-5$). (C) Localization of MLC1 in astrocyte-astrocyte junctions in cells transfected with the adenovirus expressing a control shRNA, which were visualized by the positive GFP signal. (D) Localization of MLC1 in astrocytes with reduced expression of GlialCAM was detected mostly intracellular around the nucleus (arrowheads). (E) Astrocytes were co-transfected with a shRNA against GlialCAM and flag-tagged human GlialCAM (resistant to shRNA) and processed by immunofluorescence. Localization of endogenous MLC1 was detected in astrocyte-astrocyte junctions. Scale bar: 20 μ m.

increase in surface levels detected by this method was moderate but significant. It may be that the surface levels of MLC1 quantified by this assay in astrocytes were underestimated, due to a possible masking of the extracellular HA epitope present in MLC1 by GlialCAM in astrocyte-astrocyte junctions, as happened in other membrane proteins with accessory subunits (26).

To assess whether GlialCAM can influence MLC1 stability, the disappearance kinetics of the cellular pool was monitored by WB during a cycloheximide chase (CHX). The MLC1-P92S variant showed significantly reduced stability as demonstrated by the accelerated removal of the mutant upon translation termination with CHX (Fig. 3E and F). Co-expression with GlialCAM considerably improved the protein stability of the mutated P92S variant and also of the wild-type MLC1 protein.

Knockdown of GlialCAM affects MLC1 protein expression also in HeLa cells

The above results indicate that GlialCAM has two important functions. On the one hand, as reported previously, it is necessary to target MLC1 to cell-cell junctions (18,20). On the other hand, GlialCAM is necessary to stabilize MLC1 and this stabilization is important for translocation to the plasma membrane. This second role was unexpected, as MLC1 localization at the plasma membrane was detected without GlialCAM expression in HeLa cells. To explain this controversy, we hypothesized that GlialCAM is endogenously expressed in HeLa cells at low levels. Importantly, GlialCAM protein could be detected at the plasma membrane, using a monoclonal antibody directed against extracellular GlialCAM by a chemiluminescence-based ELISA assay (Fig. 4A). Transfection of two independent shRNAs against GlialCAM reduced the antibody signal, confirming that the plasma membrane signal detected by the antibody was due to GlialCAM (Fig. 4A).

To address whether the stabilization effect of GlialCAM in MLC1 could be also observed in HeLa cells, we transfected HeLa cells with wild-type MLC1 or MLC-related mutant variants P92S (PS) or C326R (CR) together with and unrelated shRNA as a control or shRNAs against GlialCAM, and assayed the cellular and surface MLC1 expression by immunoblotting and cell surface ELISA, respectively. Knockdown of GlialCAM reduced total (Fig. 4B) and cell surface (Fig. 4C) expression of all MLC1 variants, including the wild-type MLC1, as observed in rat astrocytes. Considering that GlialCAM and MLC1 physically interact [revealed by split-TEV or FRET studies (18)], these data strongly suggest that GlialCAM exerts a stabilizing effect on MLC1, which is independent of the cell system studied.

Effect of GlialCAM MLC-related variants on MLC1 expression

GlialCAM variants containing MLC-related mutations affect GlialCAM and MLC1 trafficking to cell junctions, without substantially interfering with GlialCAM expression or the biochemical interaction between GlialCAM/MLC1 (17,18,20). We thus addressed whether *GLIALCAM* mutations can compromise MLC1 stabilization in astrocytes. To this aim, we first depleted endogenous GlialCAM in astrocytes by adenovirus-mediated RNA interference, and then complemented with wild-type GlialCAM wild-type or two mutant variants, Arg92Gln (R92Q), found in MLC2A patients, or Arg92Trp (R92W), found in MLC2B patients. As a control for protein expression, we complemented with MLC1. Astrocytes were analyzed by WB or immunofluorescence (Fig. 5 and Supplementary Material, Fig. S1). Knockdown of GlialCAM reduced both GlialCAM and MLC1 expression (Fig. 5A and Supplementary Material, Fig. S1), and led to a mislocalization of MLC1 to an intracellular compartment (Fig. 5B). After knockdown of endogenous GlialCAM, complementation with human GlialCAM rescued MLC1 protein expression (Fig. 5A and Supplementary Material, Fig. S1) and junctional localization (Fig. 5C).

Complementation with GlialCAM variants containing the mutations R92Q or R92W also rescued MLC1 protein expression (Fig. 5A and Supplementary Material, Fig. S1). However,

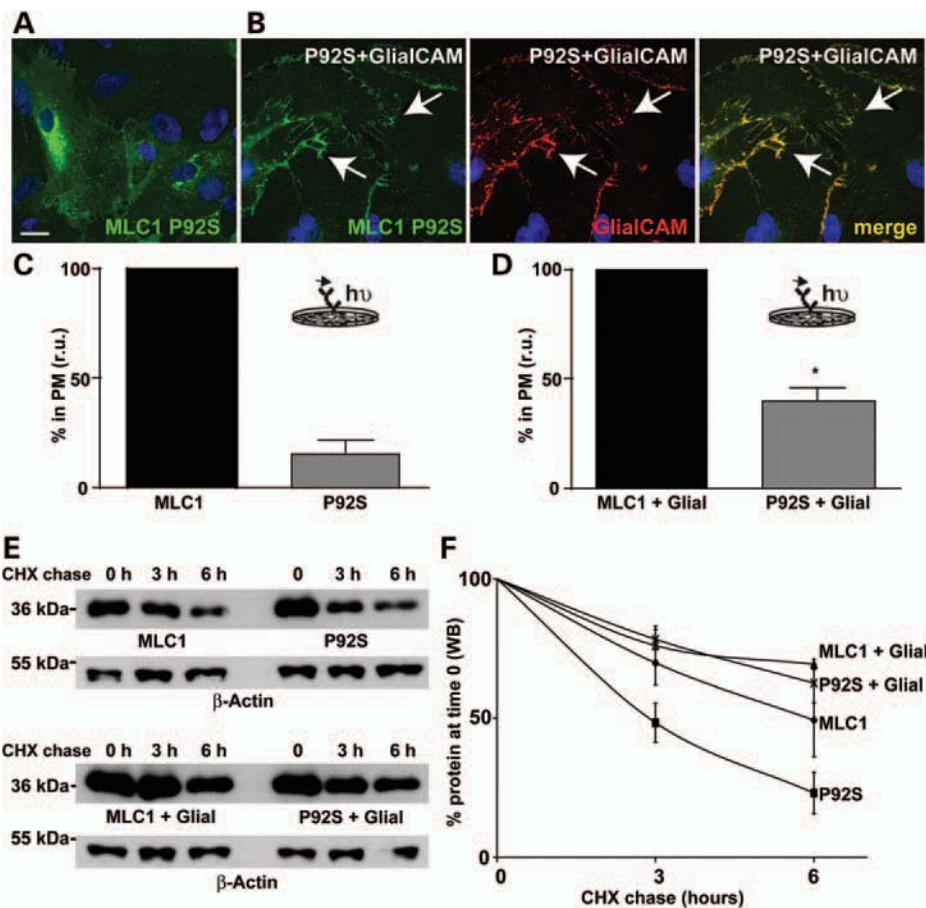


Figure 3. GlialCAM increases surface expression and protein stability of MLC1 containing MLC-related mutations in primary astrocytes. (A and B) Astrocytes were transduced with adenoviruses expressing HA-tagged MLC1 containing the MLC-related mutation P92S alone (A) or in combination with GlialCAM (B). After 48 h, cells were fixed and processed by immunofluorescence using antibodies against HA tag (3F10) or GlialCAM. The yellow merge channel indicates co-localization. Arrowheads point to contacts between astrocytes, where MLC1 P92S and GlialCAM co-localized. Scale bar: 20 μ m. (C and D) Astrocytes were transduced with adenoviruses expressing MLC1 wild-type or MLC1 containing the MLC-related mutation P92S alone (C) or in combination with GlialCAM (D). MLC1 constructs have an extracellular HA epitope. Plasma membrane levels were measured using a luminescence-based method, as described in Materials and Methods, and they were normalized to the level of the wild-type MLC1 in each condition. The inset shows an overview of the method. Data correspond to the average of three independent experiments. * $P < 0.05$, comparing the levels of the mutant at the plasma membrane with or without GlialCAM. (E and F) Astrocytes were transduced with adenoviruses expressing MLC1 wild-type or MLC1 containing the MLC-related mutation P92S alone or in combination with GlialCAM. 48 h after transduction, cells were treated or not with cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml) at the times indicated. Cells extracts were obtained, and the remaining protein was analyzed by western-blot against the HA epitope. β -Actin detection was used as a loading control. The result is a representative experiment of four with similar results. In (F), a summary of the quantification of all experiments using ImageJ software is shown. To quantify signals by WB, we performed at least three expositions of all WBs, to ensure linearity. The signal is normalized to the value at time 0 for each of the experimental groups. The stability of the mutant P92S increased significantly when co-expressed with GlialCAM ($P < 0.01$).

the junctional localization of endogenous MLC1 was not corrected by the different mutated variants (Fig. 5D for R92Q and Fig. 5E for R92W).

Volume-regulated chloride currents are affected in MLC1- and GlialCAM-depleted astrocytes

Lack of MLC1 in rat astrocytes or in lymphoblast cell lines obtained from MLC patients have been related with a defective activation of VRAC (14), whose molecular identity is still unknown (27). We next addressed whether lack of GlialCAM may also affect VRAC currents.

Previous electrophysiological studies addressing VRAC currents were performed in mild trypsin-treated astrocytes (14). As this assays needed an enzymatic treatment to round astrocytes

potentially leading to other effects related with the trypsin treatment (28), we switched to dB-cAMP-treated astrocytes that are already rounded due to the elongation of processes (29). We focused only in changes in VRAC activity, taking advantage of the fact that not all astrocytes express CIC-2 mRNA in isotonic conditions (30), but most express VRAC currents in hypotonic conditions. In both cases, reduction in MLC1 or GlialCAM led to a dramatic decrease of VRAC activity of 80%, although it was still detectable (Fig. 6).

Lack of GlialCAM and MLC1 causes astrocyte vacuolation

Lack of MLC1 in astrocytes and in MLC patients caused the appearance of vacuoles in the cytoplasm of astrocytes [(13) and compare Fig. 7A with Fig. 7B]. Similarly, knockdown of

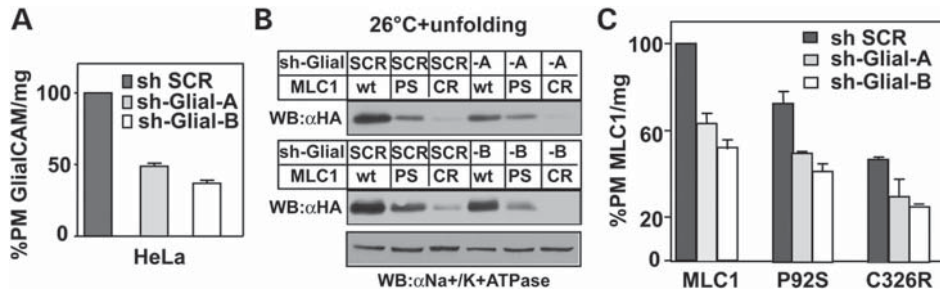


Figure 4. Effect of GlialCAM expression levels on MLC1 expression levels and trafficking in HeLa cells. HeLa cells transduced with two lentivirus expressing shRNAs against GlialCAM (sh-Glial-A, sh-Glial-B) or shRNA Scrambled (sh SCR) were analyzed with anti-HepaCAM antibody for GlialCAM cell surface expression using ELISA as described in Materials and Methods. (B) The shGlialCAM cells (A or B) were transfected with indicated MLC1 cDNAs (wt, wild-type; PS, P92S; CR, C326R). Cells were seeded on 24-well plates 20 h after transfection and incubated at 37°C for 24 h. Cells were temperature rescued at 26°C for 24 h, and unfolding was performed at 37°C for 1 h prior of experiment. They were analyzed by immunoblotting against the HA epitope present in MLC1. Na⁺-K⁺-ATPase was used as a loading control. (C) Cell surface density of MLC1 in shGlialCAM cells was done as in (A), but using anti-HA antibody. The expression was normalized for MLC1 wt expression in shSCR cells.

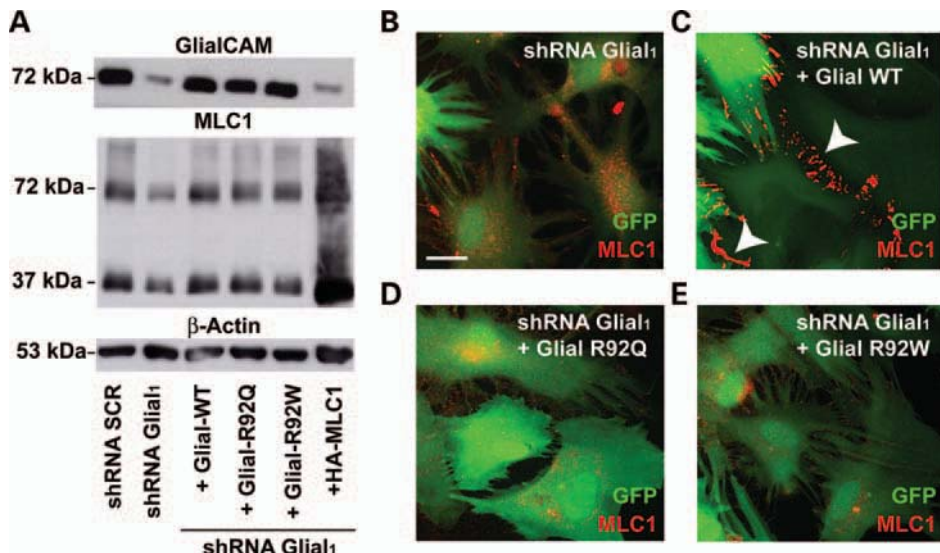


Figure 5. GlialCAM with MLC-related mutations increase MLC1 expression but show a trafficking defect. (A) Astrocytes transduced with the shRNA indicated during 7 days and complemented or not with the indicated constructs were analyzed by WB using antibodies against the indicated proteins GlialCAM and MLC1. β -Actin was used as a loading control. Four different experiments gave similar results. A quantification of several experiments is shown in Supplementary Material, Figure S1. (B–E) Similarly, for the different experimental groups showed here, astrocytes were fixed and processed by immunofluorescence using antibodies against MLC1. Green signal indicates the GFP which is co-expressed with the shRNA. Arrows label contacts between astrocytes. Scale bar: 20 μ m.

GlialCAM also led to astrocyte vacuolation (Fig. 7C). Vacuoles appearing in MLC1 or GlialCAM-depleted astrocytes were also of endosomal origin, as revealed by staining with the endosomal protein marker EEA1 (early-endosomal antigen 1) (Fig. 7B and C).

We next aimed to correlate if vacuolation was directly linked to an increase in intracellular water. Treatment of astrocytes for 24 h with a hypoosmotic medium induced the appearance of water vacuoles of endosomal origin [(15) and Fig. 7D]. To test if a defective VRAC activity causally can contribute to the vacuolation phenotype, we inhibited VRAC activity, indirectly by attenuating the chloride gradient or directly. This was accomplished by incubating astrocytes with Bumetanide (Fig. 7E), which blocks sodium/potassium/chloride co-transporters (31–34), or by DCPIB (Fig. 7F), the most specific VRAC inhibitor known (35). Both treatments led to the appearance of vacuoles of endosomal

origin. In order to correlate the biochemical and electrophysiological data with the vacuolation phenotype, we quantified the number of cells containing vacuoles for all experimental groups (see Materials and Methods). Quantification of the vacuolation phenotype in cells treated with Bumetanide or DCPIB revealed a similar degree of defect as cells treated with the shRNAs against MLC1 or GlialCAM (Fig. 8 and Supplementary Material, Fig. S4) [Bumetanide, $15.4 \pm 2.3\%$ (4 independent exp, 1033 cells); DCPIB, $18.8 \pm 2.9\%$ (4 independent exp, 1226 cells)].

Recovery of MLC1 in junctions rescued the vacuolation defect and VRAC activation

The astrocyte vacuolation caused by the lack of GlialCAM was rescued with complementation with human GlialCAM (Fig. 8A and Supplementary Material, Fig. S4). However,

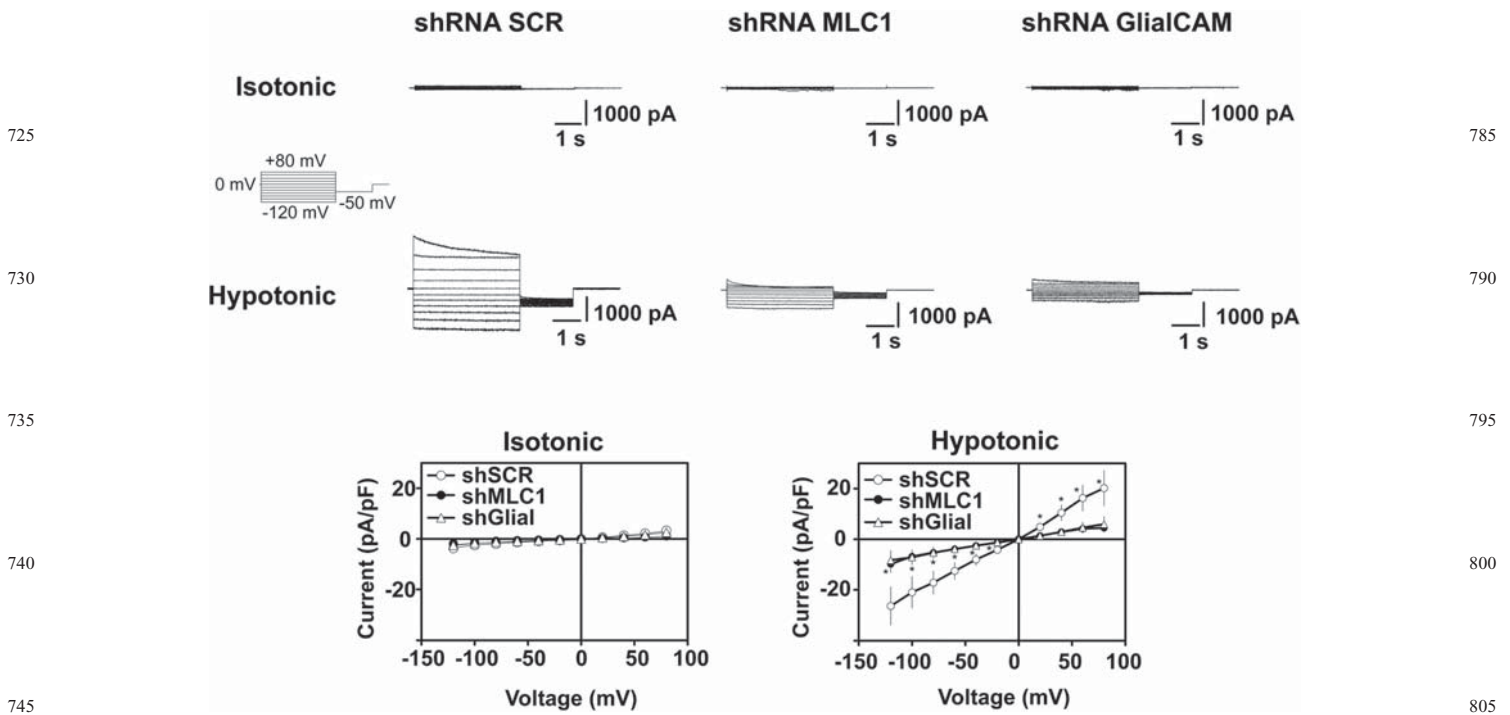


Figure 6. VRAC activity is reduced in astrocytes with reduced expression of MLC1 and GlialCAM. Representative family of whole-cell chloride currents in dbcAMP-treated cultured neocortical astrocytes transduced with shRNA scrambled or shRNA against MLC1 or GlialCAM, elicited by the pulse protocol shown in the inset. Astrocytes that did not show CIC-2-like currents in isotonic conditions were selected. They correspond to about 60% of recorded cells. In about 85% of these cells do not having CIC-2 current in isotonic conditions, application of a hypotonic solution activated VRAC current. As expected, these currents were blocked by DCPIB, but not with iodide replacement (data not shown). The plot shows average steady-state current–voltage relationship of dbcAMP-treated astrocytes transduced with shRNA SCR (circles), shRNA MLC1 (filled circles) or shRNA GlialCAM (triangles) in isotonic and hypotonic conditions. Results corresponds to $n = 15$ for shRNA SCR, $n = 14$ for shRNA MLC1 and $n = 14$ for shRNA GlialCAM. $*P < 0.05$ t -test versus scramble for both MLC1 and GlialCAM groups.

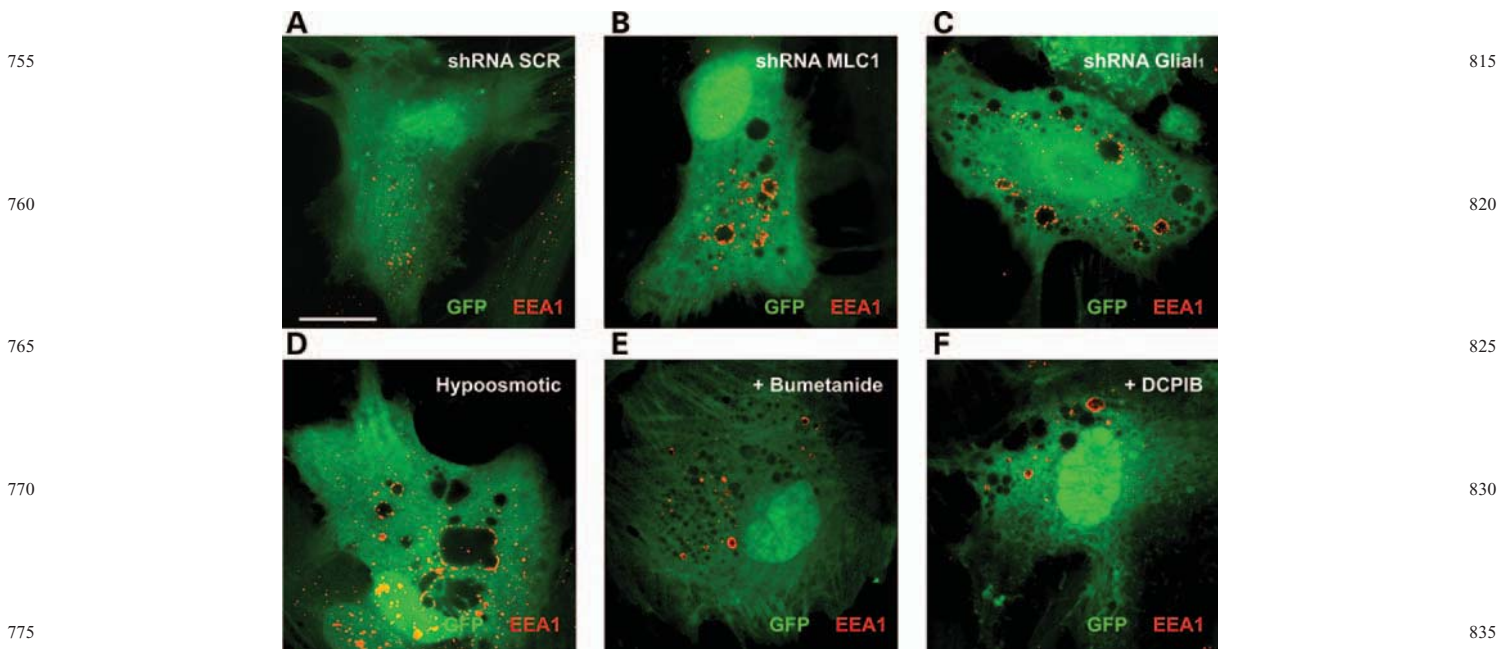


Figure 7. Similarities between the vacuolation induced by the lack of GlialCAM and the inhibition of VRAC activity. (A–C) Primary cultures of astrocytes were transduced with adenovectors expressing shRNA SCR, shRNA against MLC1 or shRNA against GlialCAM. After 7 days, cells were fixed and immunostained using antibodies against early-endosomal antigen 1 (EEA1). In (D–F), cells were transduced with adenovector expressing shRNA SCR and incubated with 50 μ M bumetanide during 7 days (D) or 10 μ M DCPIB during 7 days (E) or with a hypo-osmotic medium during 24 h (F). Cells were then fixed and immunostained using antibodies against EEA1. Green signal corresponds to GFP which is expressed together with the shRNA. Scale bar: 20 μ m.

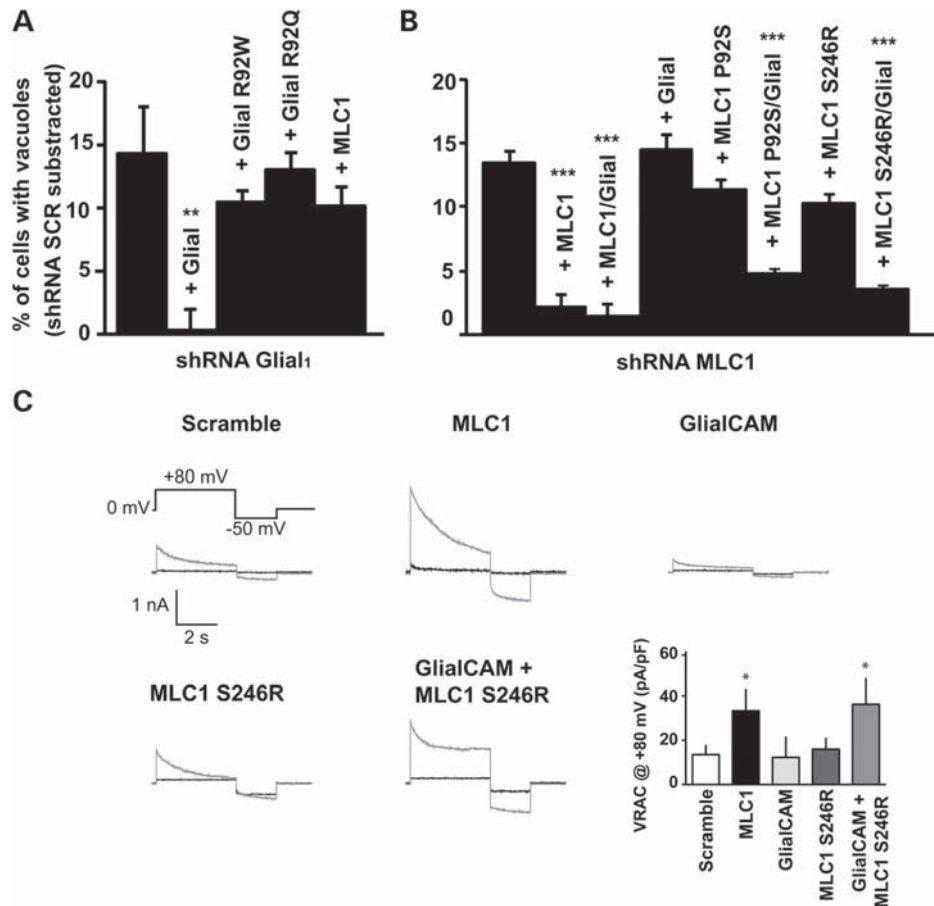


Figure 8. Correlation between VRAC activity and the vacuolation phenotype of astrocytes. (A and B) Quantification of the number of cells showing vacuolation after transduction with the shRNA-indicated and complemented or not with adenoviruses expressing the indicated constructs. In (A), data correspond to four to five independent experiments with the number of cells analyzed for each group as follows: shRNA SCR ($n = 1483$), shRNA Glial1 ($n = 1646$), shRNA Glial1 + Glial ($n = 1502$), shRNA Glial1 + Glial R92W ($n = 1776$), shRNA Glial1 + Glial R92Q ($n = 1917$), shRNA Glial1 + MLC1 ($n = 1606$). ** $P < 0.01$ compared with shRNA Glial1. The background of cells with vacuoles of shRNA SCR (MOI 10) is $13.81 \pm 1.98\%$. In (B), data correspond to four to five independent experiments with the number of cells analyzed for each group as follows: shRNA SCR ($n = 1009$), shRNA MLC1 ($n = 1064$), shRNA MLC1 + MLC1 ($n = 1094$), shRNA MLC1 + Glial ($n = 1164$), shRNA MLC1 + MLC1 P92S ($n = 1585$), shRNA MLC1 + MLC1 P92S + Glial ($n = 1379$), shRNA MLC1 + MLC1 S246R ($n = 1248$), shRNA MLC1 + MLC1 S246R + Glial ($n = 1203$). *** $P < 0.001$ compared with shRNA MLC1. The background of cells with vacuoles of shRNA SCR (MOI 5) is $5.38 \pm 1.23\%$. (C) Representative traces at +80 mV of whole-cell chloride currents in isotonic (black) or hypotonic conditions (grey) elicited by the pulse protocol showed in the inset, in dbcAMP-treated cultured neocortical astrocytes transduced with shRNA scrambled or adenoviruses over-expressing MLC1, GlialCAM, MLC1 S246R or GlialCAM + MLC1 S246R. Astrocytes that did not show CIC-2 currents in isotonic conditions were selected. The plot shows average conductance values at +80 mV in hypotonic conditions. Results correspond to $n = 9$ for shRNA SCR, $n = 8$ for MLC1, $n = 5$ for GlialCAM, $n = 9$ for MLC1 S246R and $n = 9$ for GlialCAM + MLC1 S246R. * $P < 0.05$ t -test versus Scramble for all groups. Differences in the kinetics of inactivation were observed between groups in an unrelated manner, even in the same experimental group, and probably are related with differences in ionic strength between cells.

complementation with GlialCAM containing the MLC-related mutations R92Q or R92W, or further expression of MLC1 did not rescue the vacuolation defect (Fig. 8A). In agreement with these cellular defects, localization of over-expressed human MLC1 in GlialCAM-depleted astrocytes was detected mostly intracellularly (Supplementary Material, Fig. S5).

Similarly, vacuolation caused by the lack of MLC1 was rescued by expressing MLC1 or GlialCAM together with MLC1 (Fig. 8B). However, further expression of GlialCAM did not rescue the vacuolation phenotype. Rescue of MLC1 expression by MLC1 containing MLC-related mutations also failed to counteract the vacuolation phenotype (Fig. 8B), probably due to its intracellular localization (Fig. 3). However,

restoring the localization of these proteins in junctions (Fig. 3) after co-expressing with GlialCAM successfully suppressed the vacuolation (Fig. 8B).

We next addressed whether the vacuolation could be correlated with changes in VRAC activity. Over-expression of MLC1 in dbcAMP-treated astrocytes increased VRAC activity [Fig. 8C and (14)]. However, over-expression of GlialCAM alone or MLC1 containing the MLC-related mutation S246R did not increase VRAC activity [Fig. 8C and (14)]. In agreement with the rescue of the vacuolation defect, over-expression of MLC1 S246R together with GlialCAM also increased VRAC activity (Fig. 8C). Therefore, we suggest that defective VRAC activity may be directly linked to astrocyte vacuolation.

DISCUSSION

In this work, we have studied the effects of reducing GlialCAM expression in astrocytes, a recently identified MLC1 and CIC-2 subunit (18,20). Taking into account these new results presented here, we conclude that whereas GlialCAM is necessary for the targeting to astrocyte–astrocyte junctions of both MLC1 and CIC-2 (18,20), it has an additional role as an MLC1-chaperone. Based on the fact that the stabilization is observed in HeLa cells, that GlialCAM interacts directly with MLC1 (18) and that GlialCAM stabilizes also ER retained folding mutant variants of MLC1 (18), we propose that GlialCAM may protect MLC1 from ER-associated degradation. We hypothesize that this ER-protective effect of GlialCAM was not previously recognized due to the presence of endogenous GlialCAM expression in all the cell lines studied. Thus, it can be seen how expression of MLC1 in astrocytes without GlialCAM resulted in no plasma membrane staining of MLC1. As expression of MLC1 in astrocytes alone is able to arrive to the plasma membrane, it suggests that astrocytes should have an excess of endogenous GlialCAM compared with MLC1.

It has been shown that MLC-related mutations in GlialCAM do not substantially affect the interaction with MLC1 (18). Here, we also show that MLC-related GlialCAM variants are able to stabilize MLC1 protein, although they are not able to direct MLC1 to astrocyte junctions.

Reduction in both GlialCAM and MLC1 led to astrocyte vacuolation and a decreased VRAC activity (14). The function of VRAC currents which are heterogeneous is related with the efflux of water during the regulatory volume response (36). A decreased VRAC activity may cause an increase of intracellular water. We suggest that astrocyte vacuolation could be a consequence of increased water content, as blocking VRAC or the presence of a hypoosmotic medium (15) led to a similar type of vacuolation of endosomal origin. However, it is not clear how increased water content causes the appearance of vacuoles. It could be that astrocytes, which are cells evolutionary adapted to live in changing osmotic conditions, have gained the ability to keep the excess of intracellular water in the form of a vacuole, as happens in other organisms that form contractile vacuoles, and then they can survive in extracellular changing conditions (37–41).

How MLC1 and GlialCAM are related to VRAC activity? At this moment, it is very difficult to provide a clear answer to this question, as the function of MLC1 is unknown and the protein(s) responsible for VRAC activity still have to be discovered (27). Identification of the VRAC channel is a major and difficult task, as revealed by the reports of many potential candidates that later turned out to be wrong, such as ICln, p-Glycoprotein or the CIC-3 transporter (27,36). GlialCAM may affect VRAC activity due to the lack of MLC1, as GlialCAM over-expression by itself cannot compensate the vacuolation caused by the lack of MLC1. However, we believe that it is unlikely that MLC1 is directly responsible of VRAC, as VRAC activity is present in all the cells of the body (36), whereas MLC1 is mostly restricted to the brain and no other MLC1-homologous genes exists in mammals (7). In addition, VRAC activity is still present in astrocytes depleted of MLC1. MLC1 may affect VRAC activity indirectly, for instance, by modifying the adhesion strength of astrocytes or by affecting water or chloride handling in the brain. In this sense,

aquaporin 4 depletion has also been shown to affect VRAC activity (42). It is worth to mention that MLC1 protein has also been found surrounding the endosomal membranes of astrocytes treated with a hypoosmotic solution (15) or with blockers such as DCPIB or Bumetanide (this work, data not shown). In these endosomal vesicles, MLC1 could contribute to the formation of water vacuoles by regulating water and/or chloride fluxes.

Interestingly, although GlialCAM proteins containing MLC-related mutations re-establish MLC1 protein expression, they do not direct MLC1 to junctions and are not able to rescue the vacuolation defect caused by the lack of MLC1. Therefore, we suggest that the correct localization of MLC1 is critical to perform its physiological function. In relation with putative roles suggested for MLC1 in ion transport or adhesion (10,14), its localization in junctions may be needed to allow transcellular fluxes of solutes or to detect easily changes in adhesion strength.

No treatment exists yet for MLC disease (1). Although the role of MLC1 is unknown, over-expression of GlialCAM rescues the vacuolation and the VRAC activity defect caused by some MLC1 mutants. Thus, the present data suggest that therapeutic strategies aimed at improving the surface expression of MLC1 or increasing the activity of VRAC may be envisaged as beneficial for MLC patients. This could be done by isolating pharmacological chaperones based on increased MLC1 plasma membrane expression (43) or molecules aimed to increase VRAC activity, as has been done for other chloride channels (44).

MATERIALS AND METHODS

Primary culture, adenoviral transduction and vacuolation analysis

Rat primary quiescent astrocyte cultures were prepared as described previously from P0–P2 pups (13). Dibutyl-*c*-AMP differentiated rat astrocytes, which were used for electrophysiological measurements, were obtained as described (29). Adenoviruses expressing three copies of the flag epitope fused to human GlialCAM, either wild-type or containing the MLC-related mutations R92Q or R92W have been described (17). Similarly, adenoviruses expressing HA-tagged wild-type MLC1 or containing the MLC-related mutations S246R or P92S were also constructed. Transduction of astrocytes was performed as already described (25).

To study the vacuolation of astrocytes, we counted the cells with showed clear vacuoles. A cell was positive for vacuolation if have at least three vacuoles of a size bigger than 0.5 μ m. The minor vacuolation observed in astrocytes transduced with the corresponding group expressing SCR shRNA instead of the specific shRNA was subtracted from all the experimental groups. This was done to compare directly MLC1 and GlialCAM depleted astrocytes, as the multiplicity of infection was different between both groups (MOI 5 for shRNA MLC1 and MOI 10 for shRNA GlialCAM) and the day of processing after the infection (5 days for shRNA MLC1 and 7 days for shRNA GlialCAM).

RNA interference and RT-qPCR

RNAi entry-clone (Gateway, Invitrogen) vectors were prepared using the Block-it PolII miR RNAi EmGFP expression vector kit following manufacturer's instructions. Entry clones were

recombined using LR clonase into the vector pAdVD EST-CMV/V5. Adenoviruses were produced and titrated using fluorescence microscopy detecting EmGFP which is expressed together with the shRNA. The adenoviruses expressing a negative control shRNA (shRNA SCR, scrambled) or expressing an shRNA directed against rat MLC1 (shRNA 905) were described previously (13). The sequence of the oligos used to knockdown rat GlialCAM expression was: shRNA Glial1 (shRNA 1392): 5'aagatcagcgcctccaccattgtttggccactgactgacaatgggtggcgtgatctt3' and shRNA Glial2 (shRNA 908): 5'tatagagcgcattggattctgtttggccactgactgacagaatccaggcgtctata3'.

Total RNA was prepared from a 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. RNA was stored at -80°C until further use. Eight hundred to 1000 ng of total RNA were reverse-transcribed with Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche) following manufacturer's instructions at 25°C for 10 min followed by 50°C for 60 min, using random hexamers as primers. cDNA was stored at -80°C . qPCR was performed with Lightcycler 480 probes master kit (Roche) following manufacturer's instructions in a final volume of 10 μl , with cDNA at 1:10 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/rtpcr/upl/index.jsp?Id=UP030000>) considering exon spanning and covering all splicing species and have been previously indicated (13). qPCR was run in a LightCycler 480 II on 384 well plates with the settings previously indicated. Efficiency curves were used for each of the analyzed genes and relative gene expression for each sample was calculated using ACTB (actin) as reference after testing its suitability for the experimental setup. All amplifications were inside the linear range. Data came from six 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 made with Light-Cycler 480 SW 1.5 software (Roche) and MS-Excel and MS-Access 2007. Significance was calculated using a Bootstrap method (45), BootstRatio (<http://regstattools.net/br/>), using the 'with control sample' condition and following tool instructions. Scrambled was used as a control sample.

For HeLa cells knockdown, constitutive (pGIPZ) lentivirus vectors, encoding shRNAmir-adapted short hairpin RNA specific for GlialCAM (GIPZ, V2LMM_69402 and V3LHS_413353), non-targeted variant (NT, ATCTCGCTTGGGCGAGAG-TAAG), were obtained from Thermo Scientific, OpenBiosystems (USA). Lentivirus was produced and HeLa cells were transduced as described (46).

Immunofluorescence, western and surface expression studies in cells

For immunofluorescence staining, cells were fixed and processed as previously described (25). Antibodies used were the following: anti-GlialCAM [1:100, (17)], anti-MLC1 [1:100, (10)], anti-Occludin (1:100, Zymed), anti- β -Catenin (1:250, BD Transduction Lab), anti-Connexin 43 (1:100, Zymed) and anti-EEA1 (early endosomal antigen 1) (1:100, AbCAM). For WB studies, astrocyte lysates were prepared

and processed as previously described (25). β -Actin protein levels were used as a loading control. To quantify signals by WB, we performed at least three expositions of all WBs, to ensure linearity. Scanned images were quantified using Multi-gauge software (Fujifilm) or the freely available Image J program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) with similar results. Surface expression in transfected mammalian cells or astrocytes was performed as previously described (25).

In HeLa cells, the PM density of MLC1 and GlialCAM knock-down efficiency were determined by ELISA-based assay. HeLa cells expressing shGlialCAM or shSCR were transfected with MLC1 cDNA constructs with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 72 h prior to analysis. Cells were seeded on 24 well plates 20 h after transfection and incubated at 37°C for 24 h. Cells were temperature rescued at 26°C for 24 h, and unfolding was performed at 37°C for 1 h prior of experiment. Primary and secondary Abs were bound on ice in DMEM containing 5% bovine serum (Gibco, USA). The extracellular epitope was detected with mouse anti-human HepaCAM (1:1000, R&D Systems, USA) and mouse anti-HA (1:1000 c111, Covance, Canada) antibodies. Excess antibody was washed away and specific binding was determined by HRP-conjugated secondary Ab (Amersham Biosciences, Canada) with Amplex® Red (Invitrogen) as a substrate. The fluorescence intensity was measured from quadruplicate samples using a Infinite 1000 m PRO (Tecan Group Ltd, USA) fluorescence plate-reader at 544 nm excitation and 590 nm emission wavelengths. Total Ab binding was corrected with non-specific Ab binding, determined in mock transfected cells.

For immunoblotting, the cells were lysed in RIPA buffer containing 10 μM MG132, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin + leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 mM *N*-ethylmaleimide. Polypeptides were separated by SDS-PAGE and probed by immunoblotting using Supersignal Western Pico (Pierce, USA). $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ -Atpase (1:500, Santa Cruz, USA) was used as a loading control.

Patch-clamp experiments of astrocytes

Three days before the experiment, dB-cAMP differentiated astrocytes were trypsinized and replated at a density of 1- to 3×10^4 onto 24-well plates containing a glass cover slip with DMEM supplemented medium and 250 μM dB-cAMP. For electrophysiological recordings, the glass cover slip was mounted on the stage of an inverted microscopy equipped with phase-contrast optics and fluorescence illumination. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Clark Electromedical, UK) and used after fire polishing (Narishige, Japan). Electrophysiological recordings were performed with a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Molecular Devices, Union City, CA, USA) Patch electrodes were fabricated in a Flaming/Brown micropipettepuller P-97 (Sutter instruments). Electrodes had a resistance between 4 and 5 M Ω when filled with intracellular solution (in mM): 144 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 5 HEPES at pH 7.3 and 308 ± 2 mOsm/kg. Extracellular solution contained (in mM): 144 NMDG-Cl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, 5 glucose at pH 7.4 and 310 ± 3 mOsm/kg. Hypotonic extracellular solution (-25%) was prepared by decreasing NMDG-Cl concentration to 105 mM (229 ± 2 mOsm/kg). All solution osmolarities were adjusted with sorbitol. An Ag/AgCl ground electrode

mounted in a 3 M KCl agar bridge was used. Membrane currents were recorded in the whole-cell patch clamp configuration, filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz and acquired with pClamp 9 software (Molecular Devices). Data were analyzed with Clampfit 9 (Molecular Devices) and Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Whole-cell capacitance and series resistance were compensated with the amplifier circuitry. Series resistance was always kept below 10 MΩ and compensated at 70–80%. All recordings were performed at room temperature (22–23°C). Currents were evoked with 4 s pulses from +80 to –120 mV from a holding potential of 0 mV.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michael Pusch, Thomas Jentsch and Herbert Schwarz for helpful comments about the manuscript.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This study was supported in part by SAF 2009-07014 (R.E.) and SAF2012-31486 (R.E.), PS09/02672-ERARE to R.E., ELA Foundation 2009-017C4 project (R.E. and V.N.), 2009 SGR 719 (R.E.), FISPI11/01601 (X.G.), 2009 SGR869 (X.G.), RD12/0034/0003 (X.G.), SAF 2009-12606-C02-02 (V.N.), 2009 SGR01490 (V.N.) and Canadian Institute of Health Research and Canada Foundation of Innovation (G.L.). G.L. is a Canada Research Chair and RE is a recipient of an ICREA Academia prize.

REFERENCES

- van der Knaap, M.S., Boor, I. and Estevez, R. (2012) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: chronic white matter oedema due to a defect in brain ion and water homeostasis. *Lancet Neurol.*, **11**, 973–985.
- van der Knaap, M.S., 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., 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.
- 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.
- Gelal, F., Calli, C., Apaydin, M. and Erdem, G. (2002) Van der Knaap's leukoencephalopathy: report of five new cases with emphasis on diffusion-weighted MRI findings. *Neuroradiology*, **44**, 625–630.
- De Stefano, N., Balestri, P., Dotti, M.T., Grosso, S., Mortilla, M., Morgese, G. and Federico, A. (2001) Severe metabolic abnormalities in the white matter of patients with vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. A proton MR spectroscopic imaging study. *J. Neurol.*, **248**, 403–409.
- 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.
- 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.
- 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.
- Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004) Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
- 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.
- Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M.C., Montolio, M., Lopez-Hernandez, T., Boor, I., Lien, C.F., Hagemann, T., Messing, A. *et al.* (2011) Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 228–238.
- Ridder, M.C., Boor, I., Lodder, J.C., Postma, N.L., Capdevila-Nortes, X., Duarri, A., Brussaard, A.B., Estevez, R., Scheper, G.C., Mansvelder, H.D. *et al.* (2011) Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts: Defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain*, **134**, 3342–3354.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Macioce, P., Macchia, G., Gaetani, M., Aloisi, F., Petrucci, T.C. and Ambrosini, E. (2011) The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: New insights into MLC pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 90–103.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Molinari, P., Visentin, S., De Nuccio, C., Macchia, G., Aiello, C., Bertini, E., Aloisi, F., Petrucci, T.C. *et al.* (2012) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 functionally cooperates with the TRPV4 cation channel to activate the response of astrocytes to osmotic stress: dysregulation by pathological mutations. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2166–2180.
- 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.
- Lopez-Hernandez, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernandez-Duenas, V., Scheper, G.C., van der Knaap, M.S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I. *et al.* (2011) Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3266–3277.
- 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.
- Jeworutzki, E., Lopez-Hernandez, T., Capdevila-Nortes, X., Sirisi, S., Bengtsson, L., Montolio, M., Zifarelli, G., Arnedo, T., Muller, C.S., Schulte, U. *et al.* (2012) GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a Cl⁻ channel auxiliary subunit. *Neuron*, **73**, 951–961.
- 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 ClC-2. *J. Neurosci.*, **27**, 6581–6589.
- 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.
- Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., van Berkel, C., Polder, E., Tollard, E., Darios, F. *et al.* (2013) Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: An observational analytical study. *Lancet Neurol.*
- 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.

25. 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. 1325
26. Leisle, L., Ludwig, C.F., Wagner, F.A., Jentsch, T.J. and Stauber, T. (2011) ClC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl(-)/1H(+)-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J.*, **30**, 2140–2152.
27. Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. and Zdebik, A.A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.*, **82**, 503–568. 1330
28. Parkerson, K.A. and Sontheimer, H. (2004) Biophysical and pharmacological characterization of hypotonically activated chloride currents in cortical astrocytes. *Glia*, **46**, 419–436.
29. 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. 1335
30. Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M. and Anderova, M. (2012) Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS ONE*, **7**, e29725. 1340
31. Gagnon, K.B., Adragna, N.C., Fyffe, R.E. and Lauf, P.K. (2007) Characterization of glial cell K-cl cotransport. *Cell. Physiol. Biochem.*, **20**, 121–130. 1340
32. 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**, 437–448. 1345
33. Su, G., Kintner, D.B., Flagella, M., Shull, G.E. and Sun, D. (2002) Astrocytes from na(+)-K(+)-cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **282**, C1147–C1160. 1350
34. Su, G., Kintner, D.B. and 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. 1350
35. Zhang, Y., Zhang, H., Feustel, P.J. and Kimelberg, H.K. (2008) 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**, 514–520. 1385
36. Nilius, B. and Droogmans, G. (2003) Amazing chloride channels: An overview. *Acta Physiol. Scand.*, **177**, 119–147. 1385
37. Komsic-Buchmann, K., Stephan, L.M. and Becker, B. (2012) The SEC6 protein is required for contractile vacuole function in chlamydomonas reinhardtii. *J. Cell. Sci.*, **125**, 2885–2895. 1390
38. Schonemann, B., Bledowski, A., Sehring, I.M. and Plattner, H. (2012) A set of SNARE proteins in the contractile vacuole complex of paramecium regulates cellular calcium tolerance and also contributes to organelle biogenesis. *Cell Calcium*.
39. Sivaramakrishnan, V. and Fountain, S.J. (2012) Intracellular P2X receptors as novel calcium release channels and modulators of osmoregulation in dictyostelium: a comparison of two common laboratory strains. *Channels (Austin)*, **7**. 1390
40. Ulrich, P.N., Jimenez, V., Park, M., Martins, V.P., Atwood, J. 3rd, Moles, K., Collins, D., Rohloff, P., Tarleton, R., Moreno, S.N. *et al.* (2011) Identification of contractile vacuole proteins in trypanosoma cruzi. *PLoS ONE*, **6**, e18013. **Q2** 1395
41. Essid, M., Gopaldass, N., Yoshida, K., Merrifield, C. and Soldati, T. (2012) Rab8a regulates the exocyst-mediated kiss-and-run discharge of the dictyostelium contractile vacuole. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1267–1282. 1400
42. 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. 1400
43. Okiyoneda, T., Veit, G., Dekkers, J.F., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., Roldan, A., Verkman, A.S., Kurth, M., Simon, A. *et al.* (2013) Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nat. Chem. Biol.* 1405
44. Verkman, A.S. and Galiotta, L.J. (2009) Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 153–171. 1405
45. Cleries, R., Galvez, J., Espino, M., Ribes, J., Nunes, V. and de Heredia, M.L. (2012) BootstRatio: a web-based statistical analysis of fold-change in qPCR and RT-qPCR data using resampling methods. *Comput. Biol. Med.*, **42**, 438–445. 1410
46. Apaja, P.M., Xu, H. and Lukacs, G.L. (2010) Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, **191**, 553–570. 1415

Q2

1415

1420

1425

1430

1435

1440