



Bases moleculars de la Leucoencefalopatia Megalencefàl·lica amb Quists subcoricals. Utilització de models animals i cel·lulars

Sònia Sirisi Dolcet

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.

**Bases moleculars de la Leucoencefalopatia
Megalencefàlica amb Quists subcorticals.
Utilització de models animals i cel·lulars.**

Tesi doctoral: Sònia Sirisi Dolcet

Departament de Ciències Fisiològiques II, Unitat de Fisiologia

Universitat de Barcelona 2014

Directors:

Raúl Estévez Povedano i Virginia Nunes Martínez

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, 2014

SÒNIA SIRISI DOLCET

La interessada,

Sònia Sirisi Dolcet

Els directors de la tesi,

Raúl Estévez Povedano

Virginia Nunes Martínez

Departament de Ciències Fisiològiques II, UB

AGRAÏMENTS

Segons el diccionari una Tesi és una *dissertació escrita sobre un tema l'estudi del qual comporta un treball d'investigació i d'aportació personals, presentada per l'aspirant al títol acadèmic de doctor a la corresponent facultat universitària.*

Per mi la Tesi ha estat molt més que un treball d'investigació. La realització d'aquesta Tesi ha estat una lluita constant, una prova de superació personal, una etapa de la meua vida molt important en que he viscut moments bons i altres no tant bons, i una etapa en que he pogut reflexionar sobre moltes coses, i no només de ciència. Però el més important es que aquesta etapa no l'he viscut sola, per sort he tingut molta gent al meu voltant compartint amb mi tota aquesta experiència. Per aquesta raó vull dedicar unes paraules a totes les persones que han format part d'aquest llarg viatge.

En primer lloc vull agrair als meus directors, el Dr. Raúl Estévez i la Dra. Virginia Nunes, l'oportunitat que m'han donat de formar part dels seus equips i de poder realitzar aquest treball al seu costat. **Raúl**, durant aquests anys m'has ensenyat moltes coses però sobretot a disfrutar de la ciència, la teua passió s'encomana fàcilment i t'agraeixo que m'hagis transmès aquest sentiment. **Virginia**, tot i no haver compartit tantes hores juntes la confiança que has dipositat en mi ha estat molt important, sobretot en moments durs i crítics que comporta la realització d'una Tesi i t'ho agraeixo de tot cor.

I aquest treball no seria el mateix sense els companys de laboratori amb quals he compartit gran part del meu temps aquests últims anys.

Tania, Xavi i Tanit, junts formem un gran equip!!! Hem viscut una gran quantitat de moments que mai oblidarem: sopars, cafès, rialles, viatges, festes, plors, empenyades varies...però el més important es que ja no som simplement companys de laboratori sinó que ens hem fet AMICS.

Tania, sabes perfectamente que te admiro cómo científica y sobretodo cómo persona porque eres fuerte y luchadora. Hasta en los momentos más duros para tí, siempre has estado allí para nosotros, para ayudarnos en lo personal y ser nuestra guía en el lab. Gracias a tí y a Fran por formar parte de mi vida. Sabes que aunque ahora estemos lejos estoy aquí siempre para recibirte con los brazos abiertos. **Xavi**, que t'he de dir que no sapiguis i que no sapigui ningú que ens coneix a tots dos. Ets un GRAN científic i una persona senzilla, humil i sincera i aquestes característiques em van "enamorar" de tu a l'instant. Per mi has estat una de les persones més importants aquests anys, m'has ajudat tantíssim!!! He comptat amb tu en lo professional i en lo personal. I no ens podem oblidar de les nostres llargues xerrades, els farts de riure, de les cançons dedicades a les

proteïnes...se que aquesta complicitat que tenim no la perdrem mai i això em fa feliç!! Gràcies per tot. **Tanit**, ets la felicitat personificada!! I tot i els mals moments que has passat sempre estàs allà per regalar un somriure a la vida, i a nosaltres. La teva positivitat ha fet que en molts moments no ens enfonséssim i que no abandonéssim. Ets una persona intel·ligent i molt valenta i a mi m'has ajudat moltíssim aquest últim any en que ens hem trobat les dues "soles". Crec que aquest temps ha servit per acabar d'unir-nos. Gràcies per compartir aquest temps amb mi.

Héctor, Carla i Xabi, el nou equip MLC!! Sense vosaltres aquesta Tesi tampoc hagués estat el mateix.

Héctor, aunque no hemos trabajado mucho juntos se que eres bueno en esto y que sacarás un muy buen trabajo. Gracias por los ratos compartidos y mucha suerte!!! **Carla**, quan et vas reincorporar a l'equip ens vam posar molt contents perquè tots confiàvem amb tu. Ets una persona senzilla que ens aporta tranquil·litat i sempre tens un moment per escoltar i per ajudar als altres. Moltes gràcies per tot i molta sort!! **Xabi**, el meu aprenent!! Quin any més intens que hem tingut...jejejeje. Que t'he de dir...Moltes gràcies per estar al meu costat aquest últim tram de la Tesi, m'has ajudat més del que t'imagines!!! Tens molt de potencial i se que trauràs una gran Tesi, molta sort!!! Però cuidado no et perdis entre tants astros ;)

I evidentment no m'oblido de donar gràcies als postdocs del lab. **Marisol**, gràcies per tot el que em vas ensenyar durant el temps que vam compartir. **Alejandro**, gràcies per l'ajuda que m'has brindat sempre que ho he necessitat i per les estones compartides durant aquests anys. També vull agrair a tots els estudiants que han passat pel lab perquè molts ens han aportat aire fresc i molts cops unes bones rialles. Gemma, Cristina Pinar, Ferran, Lúdia, Josep Maria, Júlia, Cristina Gálvez i Cori, gràcies a tots!!!

També vull donar les gràcies a la gent del grup de Genètica, que tot i no compartir tantes hores amb ells per mi han estat molt importants.

Clara, primer que tot donar-te molts ànims per la teva recta final. Ets molts bona i has treballat moltíssim i segur que et surt una gran Tesi, no ho dubtis!! I evidentment no oblidaré mai les nostres perfusions tan entretingudes, jejejeje. M'hagués agradat treballar més al teu costat. Moltes gràcies per tot!!! **Ester i Laura**, sense la vostra feina amb la colònia MLC1 aquesta Tesi segur que no hagués estat el que és. Gràcies noies per facilitar-me les coses i per ajudar-me sempre que us he necessitat. **Miguel**, mi otro postdoc! Gracias por tu confianza. Siempre has estado cuando te he necesitado y siempre has valorado muy bien mi trabajo, te lo agradezco muchísimo!! **Ruth i Sandra**, tot i que vosaltres ja no esteu en el grup en sel seu moment també hem vau ajudar molt i per això també us ho vull agrair.

Però a banda de la gent del lab hi ha moltes altres persones que es mereixen aquests agraïments. Per això vull donar les gràcies també a tota la gent de Bellvitge: als jefes, als postdocs, als predocs, als tècnics, a la gent del serveis científics, al personal de l'estabulari i a les persones de la neteja i de manteniment. Vull donar les gràcies especialment a tots els **predocs** dels passadís i als de la quinta, sobretot els que estan a la recta final, amb els quals he compartit, sobretot moltes hores a la sala de cultius, molts caps de setmana al lab i ens hem ajudat en molts moments. Molts ànims i molta sort a tots nois!!! Tampoc em vull oblidar dels que un dia també van ser predocs i que ara mateix estan començant una nova etapa en la ciència a diferents llocs del món, moltes gràcies a vosaltres també!!

M'agradaria donar gràcies particularment a la **Marga** i en **Salva** per la seva paciència amb les meves constants preguntes i per haver-me ensenyat i ajudat amb el tema de l'histologia.

També vull agrair al Dr. **Manel Chiva**, el qual ens va deixar durant la realització d'aquesta Tesi, el seu suport i el seu interès per la nostra feina. A la Dra **Guadalupe Soria** per les hores dedicades a explicar-me els càlculs de les MRI. A la Dra. **Ana Méndez** per l'ajuda en l'extracció de la retina i a la Dra. **Soledad Alcántara** per ajudar-nos amb la neuroanatomia. Als Drs **Francisco Ciruela, Isidre Ferrer, Xavier Gasull, Thomas Jentsch, Maja B. Hoegg- Beiler, Ian Orozco, Mónica Folgueira i Stefano Ferroni** pels treballs realitzats en col·laboració.

Finalment agrair als Drs. **Manuel Palacín, Marta Barrachina, Mariona Arbonés, José Luis Rosa, Mercè Pérez i Cristina Fillat** per haver acceptat formar part del meu tribunal de Tesi. Moltes gràcies a tots.

I com no, són moltes les persones externes al món laboral que m'han ajudat a tirar endavant durant aquests anys.

M'agradaria començar amb les persones que van ajudar a despertar-me aquest interès per la ciència. Vull donar les gràcies als Drs **Josep M^a Argilés, Francesc López Soriano i Sílvia Busquets**, del grup de Bioquímica i Biologia Molecular del Càncer, per l'oportunitat que em varen donar de realitzar el treball de final de carrera al seu costat. **Sílvia**, de tutora a amiga. La confiança incondicional que em vas mostrar l'any que vam treballar juntes va fer possible que jo cregués que podia ser científica. Moltes gràcies per tot el que hem vas ensenyar!! Sempre guardaré els records de totes les coses que hem compartit. **Míriam**, pensant en tu i amb el final de la Tesi em ve al cap la cançó "La nit de Sant Joan" dels Strombres, jejeje. Amb tu vaig començar tot això i amb tu al meu costat ho acabo. Ho hem aconseguit, hem arribat a la meta!!! Moltes gràcies per tot bonica i sobretot molts ànims en la teva recta final!!! **Cibely**, amb tu vaig fer el primer WB!! et vull agrair-te totes les coses que

hem vas ensenyar al lab!!! I com no, vull donar gràcies al meu *bambino* preferit. **Roberto**, gracias por todo, por tus buenas palabras, por tu confianza en mí y por tu afecto! Sabes que siempre tendrás un rinconcito en mi corazón.

Els meus agraïments ara es traslladen a diferents llocs de Catalunya. Primerament agrair a tota la colla d'amics de Soses, gràcies pel vostre interès en la meva feina, i especialment vull agrair a la **Mireia** i a la **Núria** per estar SEMPRE al meu costat, per donar-me suport constantment i per compartir aquests 30 anys juntes. Moltes gràcies noies!! També vull agrair a la gent de Tarragona l'interès que han mostrat aquests anys de Tesi, sempre preguntant com anava, que havia descobert, que feia treballant els dissabtes...jejejeje.. moltes gràcies a tots, sou uns grans amics!!!! I especialment vull donar-te les gràcies a tu **Núria G**, perquè també has estat una impulsora d'aquesta Tesi. M'encantava veure la passió amb que tu ho vivies. Jo ho he aconseguit i se que tu també ho aconseguiràs. Molts ànims i moltes gràcies guapíssima!!!! **Montserrat i Luisa**, a vosaltres també us vull donar les gràcies per tot el que hem viscut juntes aquests anys, i el que viurem!!! **Montserrat** moltes gràcies per escoltar-me tantes i tantes vegades, per deixar-me desfogar amb tu en qualsevol moment i per estar sempre al meu costat. Vull que sapiguis que per mi has estat i seràs una persona molt important. Gràcies també a tota la gent que ha arribat a la meva vida durant la realització d'aquesta Tesi, els quals sempre s'han interessat per la meva feina. Gracias **Elena** por preocuparte y por preguntar siempre por mi tesis. També vull agrair als de l'Escala amb els que he compartit i espero compartir molts bons moments. Gràcies **JB's**!!!! I també vull agrair a la gent de la **Barna Family** el carinyo amb que m'han acollit en el seu grup, gràcies nois!!!!

I com no, no em vull oblidar de la meva família. Gràcies especialment a la **tietia Adelina**, la tietia **Salvadora**, la **Núria**, el **David**, la **padrineta Montse** i el **Manel**, que tot i que ens veiem molt poquet sempre us heu interessat per mi, i gràcies a la família Dolcet, al **padrinet Ramón**, l'**Imma**, l'**Eric** i l'**Iris**, per estar al meu costat en tots moments i per preocupar-vos sempre per mi. Estic encantada de formar part d'aquestes dues famílies extraordinàries!!!! Voldria agrair especialment a una personeta els bons moments que m'ha fet passar aquests anys. **Paula**, la meva princesa!!! Has estat l'alegria de la família i tot i que ara mateix no ho entenguis, en molts casos m'has fet superar un mal dia o oblidar-me de mals moments. Moltes gràcies petita!!! A més, durant aquests anys he entrat a formar part d'una altra família. També vull agrair als meus sogres, **Catalina** i **Jaume**, i a la **Betse** l'estima i l'efecte que em teniu i per fer-me sentir una més de vosaltres.

També vull agrair als meus avis el suport incondicional que m'han donat. Sempre m'heu dit que era una persona molt valenta per marxar a estudiar fora als 18 anys o per viatjar pel

món, jejeje...però sempre m'heu fet costat en tot. **Padrina Manolita** gràcies per tot el carinyo que em transmets i per estimar-me tantíssim!!! **Padrí Ramón**, allà on siguis vull que sapiguis que et trobem a faltar, tu ens vas deixar durant la realització d'aquesta Tesi, i va ser un dels moments més durs d'aquests anys, però se que et sentiries orgullós de mi, gràcies!!! I se que l'altre **Padrí Ramón** i la **Padrina Dolores** avui també es sentirien orgullosos de mi. Gràcies!!!

I les últimes paraules d'aquests agraïments són per les quatre persones més importants de la meva vida. Aquesta Tesi és per vosaltres.

Mònica, gràcies per tot!!! Saps perfectament que ets la persona que més admiro en aquest món. Gràcies per estar sempre al meu costat, en els moments bons i en els dolents, per ser la meva guia i per fer de germana i d'amiga. Gràcies per estimar-me tant i per confiar amb mi. Ets la part forta de les dues i molts cops m'has ajudat a no rendir-me, per això vull que sapiguis que aquesta Tesi també és per tu.

I als meus pares, **Anna i Josep M^a**, gràcies!! Gràcies per donar-m'ho tot en aquesta vida. Felicitat, amor, afecte, confiança...tot el que soc és gràcies a vosaltres. Sou unes grans persones i els millors exemples a seguir. La Moni i jo tenim els millors pares que podríem tenir!!!! Ens heu donat la millor educació i ens heu transmès els vostres valors. Mai us podré tornar tot l'esforç que heu fet perquè jo arribés fins aquí. Gràcies per fer-me costat amb les meves decisions, per confiar cegament en mi i gràcies per no deixar-me abandonar mai.

I les últimes paraules són per tu **Ezequiel**. En el nostre cas podríem dir que la ciència ens ha unit ;) El millor que m'ha passat aquests anys ha estat trobar-te i enamorar-me de tu. Tenir-te al meu costat em fa millor persona i la idea de compartir la vida al teu costat em fa molt feliç. Junts hem superat moments dolents però n'hem viscut de molt bons, com el viatge a Perú que mai oblidarem. Gràcies per aguantar el meu mal humor els dies dolents, per fer-me riure, per despertar-te al meu costat cada dia i dir-me que m'estimes, i sobretot per aguantar aquesta recta final de la Tesi, gràcies gràcies i gràcies!!!!

Quan acabes la part experimental i et poses a escriure et sents molt cansat, només vols que tot això acabi, només recordes les mil hores que has estat al lab, els experiments que haguessis volgut fer i no has pogut o no han sortit...però quan ja s'ha acabat te n'adones que aquests anys han valgut la pena, que l'esforç i les mil hores al lab han donat els seus fruits i sobretot te n'adones que t'emportes amb tu moltes més coses positives de les que t'esperaves. GRÀCIES!!!

Als meus pares,

A la Mònica,

A l'Ezequiel

"Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro"

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) Premi Nobel de Fisiologia i Medicina 1906

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood"

Marie Skłodowska-Curie (1867-1934) Premi Nobel de Física 1903 i Premi Nobel de Química 1911

ÍNDEX

<u>ABREVIATURES</u>	1
<u>INTRODUCCIÓ</u>	5
1. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS	
SUBCORTICALS, UN EXEMPLE DE LEUCODISTRÒFIA	7
1.1 GENERALITATS DEL SISTEMA NERVIÓS	7
1.1.1 Organització del sistema nerviós	7
1.1.2 Les cèl·lules del teixit nerviós	7
1.2 LES LEUCODISTRÒFIES: MALALTIES ASSOCIADES A DEFECTES DE	
LA MIELINA	9
1.2.1 Classificació de les leucoencefalopaties	9
1.3 LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS	
SUBCORTICALS : MLC	11
1.3.1 Característiques clíniques de la malaltia	11
1.3.2 Genètica de la malaltia	14
1.3.3 La proteïna MLC1	17
1.3.3.1 Expressió i localització de la proteïna MLC1	18
1.3.3.2 Estructura i funció de la proteïna MLC1	19
1.3.3.3 Mutacions del gen <i>MLC1</i>	22
1.3.4 La proteïna GlialCAM	23
1.3.4.1 Expressió i localització de la proteïna GlialCAM	24
1.3.4.2 Estructura i funció de la proteïna GlialCAM	25
1.3.4.3 Mutacions del gen <i>GLIALCAM</i>	26
1.4 RELACIÓ DE LA PROTEÏNA CIC-2 AMB LA FISIOPATOLOGIA MLC	28
1.4.1 La proteïna CIC-2	29

1.4.1.1 Expressió i localització de la proteïna CIC-2	29
1.4.1.2 Estructura i funció de la proteïna CIC-2	29
1.5 TERÀPIA PER ALS PACIENTS AMB MLC	30
2. FISIOLOGIA I FUNCÍO ASTROCITÀRIA	31
2.1 MORFOLOGIA I TIPUS D'ASTRÒCITS	31
2.2 FISIOLOGIA DELS ASTRÒCITS	32
2.3 REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR	33
2.3.1 Regulació del volum en els astròcits	34
2.3.1.1 Activitat VRAC i la seva implicació en la regulació del volum astrocitari	38
2.4 TAMPONAMENT DEL K^+ EXTRACEL·LULAR	41
2.4.1 Tamponament espacial de K^+ o <i>potassium siphoning</i>	41
2.4.2 Absorció de K^+	43
2.5 FORMACIÓ DE XARXES GLIALS	43
3. MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LES MALALTIES DE LA MIELINA	46
3.1 GENERACIÓ DE MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI D'ALGUNES LEUCODISTRÒFIES	47
3.1.1 <i>Vanishing White Matter</i> (VWM)	47
3.1.2 Malaltia d'Alexander (ALX)	49
3.1.3 Malaltia de Pelizaues-Merzbacher (PMD)	51
3.1.4 Malaltia de Krabbe o Leucodistròfia de cèl·lules globoides	53
3.1.5 Malaltia de Canavan	54
3.1.6 X-Adrenoleucodistròfia (X-ALD)	56

3.2 TERÀPIES PER A LES MALALTIES DE LA MIELINA	57
<u>OBJECTIUS</u>	61
<u>MATERIALS I MÈTODES</u>	65
<u>1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR</u>	67
1.1 OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA	67
1.1.1 Obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència	67
1.1.2 Transformació de bacteris	68
1.1.2.1 Mètode d'electroporació	68
1.2 OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DEL DNA PLASMÍDIC	69
1.2.1 Minipreparacions	70
1.2.2 Precipitació del DNA	71
1.2.3 Quantificació del DNA	71
1.2.4 Seqüenciació del DNA	72
1.3 CLONATGE DE DNA PLASMÍDIC	73
1.3.1 Reacció de PCR	73
1.3.2 Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (<i>splicing by overlap extension</i>)	75
1.3.3 Clonació clàssica	77
1.3.3.1 Digestió amb enzims de restricció	77
1.3.3.2 Electroforesis del DNA en gel d'agarosa	78
1.3.3.3 Purificació del DNA	79
1.3.3.4 Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina	80

1.3.3.5 Lligació	80
1.3.4 Clonació mitjançant el sistema <i>Gateway</i> (Invitrogen)	81
1.3.4.1 Clonatge mitjançant el sistema <i>Gateway</i> simple	82
1.3.4.2 Reacció <i>attB</i> x <i>attP</i> . Construcció de clons d'entrada (<i>Entry clones</i>)	83
1.3.4.3 Reacció <i>attL</i> x <i>attR</i> . Construcció de vectors d'expressió.	83
1.3.4.4 Clonatge mitjançant el sistema <i>Gateway Multisite</i> de dos fragments	84
1.3.4.5 Utilització del software <i>Vector NTI</i> per a la construcció virtual de clons	86
1.4 OBTENCIÓ DE RNA MISSATGER I RT-qPCR	86
1.4.1 Obtenció de RNA misstager a partir de teixits i de cultius cel·lulars	86
1.4.2 PCR de transcripció inversa i PCR quantitativa	87
<u>2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES</u>	89
2.1 OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL	89
2.1.1 Obtenció de la proteïna total a partir de cèl·lules i de teixit	89
2.1.2 Obtenció d'extracte de membrana total a partir de teixit	90
2.1.3 Determinació de la concentració proteica	91
2.2 ASSAIG DE Western-Blot (WB)	93
2.3 OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS	98
2.3.1 Purificació de IgGs mitjançant afinitat per al pèptid	100
2.4 IMMUNOCITOQUÍMICA	102
2.5 ELISA	105
2.6 MESURA DE L'EXPRESSIÓ EN SUPERFÍCIE PER LUMINESCÈNCIA	106
<u>3. CULTIUS CEL·LULARS</u>	109
3.1 LÍNIES CEL·LULARS	109
3.1.1 Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK293	109

3.1.2	Tripsinització	109
3.1.3	Congelació de cèl·lules	110
3.1.4	Descongelació de cèl·lules	110
3.2	TRANSFECCIÓ CEL·LULAR	110
3.2.1	Transfecció transitòria amb Transfectina (BioRad) en cèl·lules HeLa i HEK293	110
3.3	CULTIUS PRIMARIS	112
3.3.1	Obtenció de cultius primaris d'astròcits de rata i de ratolí	112
3.3.2	Obtenció de cultius primaris d'oligodendròcits de rata	115
3.3.3	Tractaments aplicats als cultius primaris d'astròcits i d'oligodendròcits	117
3.3.4	Visualització de vacuoles mitjançant <i>Calcein AM</i>	117
3.4	AMPLIFICACIÓ I OBTENCIÓ D'ADENOVIRUS	118
3.4.1	Adenovirus	118
3.4.2	Titulació d'adenovirus	120
3.5	TRANSDUCCIÓ D'ASTRÒCITS AMB ADENOVIRUS	121
4.	<u>TÈCNiques RELACIONADES AMB L'HISTOLOGIA</u>	123
4.1	OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE TEIXITS	123
4.1.1	Obtenció del teixits:cervell, cerebel, medul·la espinal i retina	123
4.1.2	Fixació dels teixits	123
4.1.3	Crioprotecció, inclusió i tall	124
4.2	TÈCNiques D'IMMUNOLocalITZACIÓ	125
4.2.1	Immunohistoquímica. Mètode del complex estreptavidina-biotina (ABC)	125
4.2.2	Immunofluorescència per talls gruixuts	127
4.2.3	Immunofluorescència per talls fins	128

4.3 MICROSCOPIA ELECTRÒNICA	129
<u>5. GENERACIÓ DEL MODEL DE RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i> CONDICIONAL PER <i>Mlc1</i></u>	130
5.1 DISSENY DE L'ESTRATÈGIA	130
5.2 GENERACIÓ DE LA COLONIA <i>KNOCK-OUT</i> PER <i>Mlc1</i>	130
5.3 GENOTIPATGE DELS ANIMALS	131
5.3.1 Extracció de DNA	131
5.3.2 PCR del genotipatge	132
6. ANNEX 1: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL	134
7. ANNEX 2: CONSTRUCCIONS GENERADES PER BIOLOGIA MOLECULAR	137
<u>RESULTATS</u>	139
<u>CAPÍTOL 1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL <i>KNOCK-OU</i> PER <i>Mlc1</i></u>	141
<u>PART 1. MODEL ANIMAL</u>	143
1. GENERACIÓ DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i> CONDICIONAL PER AL GEN <i>Mlc1</i>	143
1.1 LA COLÒNIA MLC1	144
1.2 ANÀLISI DE LA DEFICIÈNCIA DE LA PROTEÏNA MLC1	146
1.3 ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT DELS ANTICOSSOS GENERATS CONTRA LA PROTEÏNA MLC1	149
2. CARACTERITZACIÓ DE L'ANIMAL <i>KNOCK-OUT</i> DE <i>Mlc1</i>	153
2.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1	153
2.2 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT MITJANÇANT ESTUDIS DE RESSONÀNCIA MAGNÈTIDA D'IMATGE (MRI)	155
2.3 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT MITJANÇANT MICROSCÒPIA	

ELECTRÒNICA	159
2.4 ESTUDIS DE COMPORTAMENT I NEUROFISIOLOGIA EN EL RATOLÍ	
<i>KNOCK-OUT</i>	161
2.4.1 Test Rotarod	161
2.4.2 Electroretinogrames i <i>Auditory Brain Response</i> (ABR)	163
3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN EL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	167
3.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA GlialCAM	168
3.2 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2	170
4. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MLC1, GlialCAM I CIC-2 EN ELS OLIGODENDRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	173
5. MESURA DE LES CORRENTS DE CLORUR MODULADES PER CIC-2 EN EL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	174
6. ESTUDI D'ALTRES PROTEÏNES EN EL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	176
7. ESTUDI DE LES PROTEÏNES MLC1, GlialCAM I CIC-2 EN LA MEDULLA ESPINAL	178
<u>PART 2. MODEL CEL·LULAR ATROCITARI</u>	179
1. CARACTERITZACIÓ DELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	179
1.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1 EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	179
1.2 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	181
2. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	182
3. ANÀLISI D'ALTRES PROTEÏNES EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	182
4. ESTUDIS D'ELECTROFISIOLOGIA EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	185

CAPÍTOL 2. CARACTERITZACIÓ I ESTUDI BIOQUÍMIC DEL CERVELL D'UN PACIENT

<u>AMB MLC</u>	189
1. CARACTERITZACIÓ DE LA MOSTRA D'UN PACIENT	191
1.1 DADES CLÍNIQUES DE LA PACIENT	191
1.2 CARACTERITZACIÓ HISTOLÒGICA DE LA PACIENT	192
2. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DE LA MUTACIÓ QUE PRESENTADA PER LA PACIENT:S69L	194
2.1 GENERACIÓ DEL MUTANT hMLC1S69L I ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MUTADA	194
2.2 ESTUDI DE L'ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA AMB LA MUTACIÓ S69L	198
3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MLC1 I GLIALCAM EN EL TEIXIT DE LA PACIENT	199
3.1 REEXAMINACIÓ DEL TEIXIT DE LA PACIENT	201
4. ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CLC-2 EN EL TEIXIT DE LA PACIENT	202

CAPÍTOL 3. UTILITZACIÓ I GENERACIÓ DE MODELS CEL·LULARS PER A L'ESTUDI

<u>DE LA RELACIÓ FISIOLÒGICA ENTRE GLIALCAM I CLC-2</u>	205
<u>PART 1. EFECTE DEL K⁺ SOBRE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN ASTRÒCITS DE RATA I RATOLÍ</u>	207
1. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM, MLC1 i CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺	207
1.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA GlialCAM	207
1.2 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1	209
1.3 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2	210
2. ESTUDIS ELECTROFISIOLÒGICS DE GlialCAM I CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺	212

3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT	
CONTINGUT DE K⁺ EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i>	213
3.1 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM EN ASTRÒCITS DEL <i>KNOCK-OUT</i>	214
3.2 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE CIC-2 EN ASTRÒCITS DEL <i>KNOCK-OUT</i>	218
<u>PART 2. DESENVOLUPAMENT D'UN CULTIU PRIMARI D'OLIGODENDRÒCITS DE</u>	
<u>RATA PER A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ FISIOLÒGICA ENTRE GlialCAM I CIC-2</u>	219
1. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN LA SUBSTÀNCIA BLANCA	
DEL CEREBEL DE RATA	220
2. CARACTERITZACIÓ DEL CULTIU PRIMARI D'OLIGODENDRÒCITS DE RATA	221
2.1 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE MARCADORS ESPECÍFICS	
D'OLIGODENDRÒCITS	221
2.2 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN EL CULTIU PRIMARI	
D'OLIGODENDRÒCITS	222
3. ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'ALGUNES MUTACIONS DE GlialCAM EN	
OLIGODENDRÒCITS	225
4. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT	
DE K⁺ EN OLIGODENDRÒCITS	228
<u>CAPÍTOL 4. ESTUDI DE zMLC1 I zGlialCAMa <i>IN VITRO</i> I EN EL MODEL <i>KNOCK-OUT</i></u>	
<u>DE <i>zmlc1</i> EN PEIX ZEBRA</u>	231
1. ESTUDI DE zGlialCAMa <i>IN VITRO</i>	234
1.1 PURIFICACIÓ DE L'ANTICÒS CONTRA LA PROTEÏNA zGlialCAMa	235
1.2 ESTUDI <i>IN VITRO</i> DE MUTACIONS DOMINANTS DESCRITES EN PACIENTS	236
1.3 ESTUDI DEL NIVELLS D'EXPRESSIÓ DELS MUTANTS DE zGlialCAMa	239

2. ESTUDI DE zMLC1 I rCIC-2 EN PRESENCIA DE zGliaIcAMa	240
2.1 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE zMLC1 I rCIC-2 AMB PRESENCIA DE zGliaIcAMa <i>IN VITRO</i>	240
2.2 ESTUDIS ELECTROFISIOLÒGICS DE rCIC-2 AMB PRESENCIA DE zGliaIcAMa EN OÒCITS DE <i>Xenopus</i>	241
3. ESTUDIS DE LA LOCALITZACIÓ DE zMLC1 I zGliaIcAMa EN EL CERVELL DEL PEIX ZEBRA <i>KNOCK-OUT</i>	242
4. ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT MITJANÇANT ESTUDIS DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA D'IMATGE (MRI)	245
 <u>DISCUSSIÓ</u>	247
 <u>CONCLUSIONS</u>	261
 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	265
 <u>ANNEX:ARTÍCLES PUBLICATS DURANT LA REALITZACIÓ D'AQUESTA TESI</u>	285

ABREVIATURES

APS: Persulfat d'amoni

AraC: Citosina β -D-arabinofuranosida

BCA: Àcid bicinconínic

BDM: Medi basal de consituació química definida

bFGF: Factor de creixement de fibroblasts bàsic

BSA: Sèrum d'albumina bovina

cDNA: DNA complementari

CHX: Cicloheximida

CNP: 2',3'-nucleòtid cíclic 3'-fosfodiesterasa

CNTF: Factor ciliar neurotròfic

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DMSO: Dimetilsulfòxid

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol

DCPIB: Àcid oxobutíric 4-(2-butil-6,7-diclor-2-ciclopentilindan-1-on-5-il)

DEPC: Dietil pirocarbonat

DGC: Complex distrofina-glicoproteïna

D.O.: Densitat òptica

ECL: Substrat quimioluminiscent de luminol

E.Coli: *Escherichia coli*

EDTA: Àcid 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil)amino)acètic

FBS: Sèrum boví fetal

GFP: Proteïna verda fluorescent

GFAP: Proteïna fibrilar acídica de la glia

GABA: Àcid gamma-aminobutíric

Het: Heterozigot

Hipo: Hipoosmòtic

HRP: Peroxidassa de rave

Ig: Immunoglobulina

Iso: Isoosmòtic

KO: *knock-out*

MBP: Proteïna bàsica de mielina

MOI: Multiplicitat d'infecció

MRI: Ressonància magnètica d'imatges

NG2: Proteoglicà condroitinsulfat

NTPs: Nucleòsids trifosfat

OCT: Medi viscos per congelació de teixits

OPC: Cèl·lules precursors d'oligodendròcits

OPD: *o*-Fenilenediamina dihidroclor

PBS: Tampó fosfat salí

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PDGF-AA: Factor de creixement derivat de plaquetes

PFA: Paraformaldehíd

PMSF: Florur de fenilmetilsulfonil

PDGF-AA: Factor de creixement derivat de plaquetes

RNAsa: Ribonucleasa

RNA: Àcid ribonucleic

RT-PCR: Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa

RVD: Mecanisme de regulació del decreixement de volum (*Regulatory volume decrease*)

RVI: Mecanisme de regulació del creixement de volum (*Regulatory volume increase*)

SDS: Dodecilsulfat sòdic

SNC: Sistema nerviós central

SNP: Sistema nerviós perifèric

siRNA: RNA de silenciament

TAE: Tampó Tris-acetat-EDTA

TEMED: Tetrametiletildiamina

TBS: Tampó Tris-salí

TTBS: TBS-Tween 20

VRAC: *Volume regulated anion channels*

VSOAC: *Volume-sensitive organic osmolyte anion channel*

WB: Western Blot

WT: *wild-type*

INTRODUCCIÓ

La present Tesi és un recull dels darrers avenços que s'han aconseguit en la recerca de la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals. Per tal de dur a terme aquests avenços s'han utilitzat diferents models animals i cel·lulars desenvolupats al llarg d'aquest treball.

En aquest apartat d'introducció primerament s'introdueix, de forma general, el context en què es desenvolupa la malaltia. En segon lloc, es descriuen les cèl·lules principalment implicades en aquesta, els astròcits i la seva funció. I per acabar, es parla d'alguns models animals generats per a l'estudi de malalties de la mielina.

1. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS(MLC)

1.1 GENERALITATS DEL SISTEMA NERVIÓS

1.1.1 Organització del sistema nerviós

El sistema nerviós té la capacitat de dirigir una gran quantitat de processos com són el funcionament dels òrgans interns, la memòria, el pensament, l'aprenentatge, i els processos voluntaris i involuntaris de l'organisme. El sistema nerviós és divideix en: Sistema Nerviós Central (SNC) format per l'encèfal (cervell, cerebel i bulb raquidi) i la medul·la espinal; i el Sistema Nerviós Perifèric (SNP) format pels nervis cranials i els nervis perifèrics que surten de la medul·la i les seves ramificacions.

El SNC és responsable de les necessitats vitals, la coordinació i la resposta a estímuls. L'encèfal i la medul·la espinal es troben protegits per les meninges, i per l'envoltura òssea que proporciona el crani i la columna vertebral.

El SNP està constituït pel conjunt de nervis i ganglis nerviosos, que envien i reben informació de les vísceres, múscul esquelètic i òrgans dels sentits connectant-los amb el SNC. El SNP es divideix en Sistema Nerviós Somàtic, el qual relaciona l'organisme amb el medi extern; i el Sistema Nerviós Autònom, el qual relaciona el medi intern orgànic. Aquest últim es subdivideix en sistema simpàtic, encarregat de realitzar accions amb despesa energètica; i sistema parasimpàtic, encarregat d'emmagatzemar energia.

1.1.2 Les cèl·lules del teixit nerviós

El teixit nerviós, tant el central com el perifèric, està format per dos tipus cel·lulars: les neurones i les cèl·lules glials.

Les neurones són les encarregades de transmetre els impulsos nerviosos. Aquestes cèl·lules posseeixen uns processos anomenats dendrites. Les dendrites són les encarregades de rebre, integrar i transmetre els impulsos elèctrics (potencials sinàptics) procedents de cèl·lules veïnes.

Les cèl·lules glials es divideixen en dos grups: la microglia i la macroglia; aquesta última formada per cèl·lules endimials, astròcits i oligodendròcits.

La **microglia** constitueix el sistema immunològic del SNC. Està formada per cèl·lules petites amb un cos dens i allargat, i unes prolongacions ramificades. S'originen com a precursors a la medul·la òssia, i arriben al SNC a través de la sang en forma de cèl·lules fagocítiques, derivades de macròfags, on poden romandre en baix nombre i en estat quiescent durant llargs períodes. Quan en el medi apareixen productes de secreció com citoquines, aminoàcids excitatoris o radicals lliures degut a una infecció o un trauma, la microglia s'activa expressant una gran varietat d'antígens, constituint el sistema de defensa i de reparació del SNC. Però la microglia també pot provocar la destrucció del teixit i de mort neuronal segons el balanç de senyals activadores i inhibidores.

Les **cèl·lules endimials** juntament amb la musculatura llisa, els astròcits i les neurones perivasculars, constitueixen la unitat neurovascular. L'objectiu principal de la unitat neurovascular és proporcionar defenses, proveir el cervell d'energia i mantenir l'homeòstasi del microentorn cerebral. Les cèl·lules endimials constitueixen l'epiteli cerebral. Estan interconnectades amb elles mateixes per unions adherents, unions *gap* i unions *tight* que formen la barrera hematoencefàlica.

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

La **mielina** està formada per 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 cas del 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 genera la 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 que no es troben

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 s'anomena conducció saltatòria i 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 formen 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.

1.2. LES LEUCODISTRÒFIES: MALALTIES ASSOCIADES A DEFECTES DE LA MIELINA

Les leucodistròfies són un grup de malalties genètiques del sistema nerviós, on la generació, el desenvolupament i/o el manteniment de la mielina es veuen afectats. La paraula leucodistròfia prové de les arrels gregues : "*leuco*" (blanc), "*dis*" (discapacitat), "*trophos*" (creixement). El terme leucodistròfia es restringeix a aquelles malalties d'origen genètic que afecten a la mielina, excloent malalties inflamatòries i autoimmunes (com per exemple l'esclerosi múltiple), o d'origen ambiental com són les causades per l'exposició a dissolvents orgànics. Les leucodistròfies que impliquen el SNC s'anomenen **leucoencefalopaties**.

Existeixen diferents gens implicats en el manteniment i funcionament de la mielina. Defectes en aquests gens poden ser heretats seguint un patró dominant, recessiu o lligat al cromosoma X. Mutacions en aquests gens i mutacions en gens relacionats que afecten de manera indirecta la mielina poden donar lloc a aquestes patologies.

1.2.1 Classificació de les leucoencefalopaties

Les leucodistròfies són un tipus de malaltia que acostumen a aparèixer els primers anys de vida a causa de que el pic màxim de la mielinització es produeix durant els dos primers, tot i que el procés no es completa fins a l'adolescència.

Fins al moment, les leucoencefalopaties s'havien classificat seguint un criteri patològic o bioquímic. Recentment, gràcies als nous coneixements d'aquest tipus de malalties, els

experts han generat una nova classificació segons el defecte que pateixen.

	Malaltia	Gen afectat
PEROXISOMALS	Adrenoleucodistrofia (ALD)	ABCD1
	Adrenoleucodistrofia Neonatal (NALD)	PEX5; PEX1
	Síndrome Zellweger	PEX1; PEX2; PEX3; PEX5; PEX6; PEX12; PEX14; PEX26
	Malaltia de Refsum infantil (IRD)	PEX
	Malaltia de Refsum d'adult (ARD)	PHYH; PEX7
LISOSOMALS	Leucodistrofia metacromàtica (MLD)	ARSA
	Malaltia de Krabbe (GLD)	GALC
VACUOLITZANTS	Malaltia d'Alexander (AxD)	GFAP
	Malaltia de Canavan (CD)	ASPA
	Síndrome de <i>Vanishing White Matter</i> (CACH)	EIF2B
	Leucodistrofia Megalencefàlica amb quists subcorticals	MLC1; GLIALCAM
INDETERMINADES	Leucodistrofia ortocromàtica pigmentada	-
	Leucostròfia amb atàxia progressiva, sordesa i cardiomiopatia	-
	Leucodistrofia hereditària difusa amb esferiodes	-
	Síndrome de Ravine	-
	Leucoencefalopatia amb edema intramielínic	CLCN2
	Leucodistrofies indeterminades	-
HIPOMIELINITZANTS	Malaltia de Pelizaeus-Merzbacher	PLP1
	Malaltia similar a Pelizaeus-Merzbacher	GJA12/GJC2; PLP1
	Paraplegia espàstica 2 (SPG2)	PLP1
	Catarata congènita i hipomielinització	DRCTNNB1A
	Leucodistrofies relacionades amb Pol-III	POL3RA; PLO3RB
ATIPIQUES	Síndrome de Aicardi-Goutières (AGS)	TREX1; RNASEH2B; RNASEH2C; RNASEH2A; SAMHD1; ADAR1
	Leucodistrofia autosòmica dominant d'aparició en adult	LMNB1
	Xantomatosi cerebrotendinosa (CTX)	CYP27A1
	Síndrome Sjogren-Larsson	ADLH3A2
	Malaltia PCWH	SOX10
	Síndrome de Cockayne	ERCC8; ERCC6
	Dèficit de l'aminotransferasa 4-aminobutirat	ABAT
	Acidúria L-2-hidroxiglutaric	L2HGDH
	Leucoencefalopatia amb participació del tàlam i del tronc cerebral amb alt lactat	EARS2

Taula 1. Classificació de les leucodistrofies. Leucodistrofies agrupades segons el defecte que pateixen i s'especifica el gen corresponent de la malaltia en les que es coneix.

Les principals cèl·lules encarregades de la formació de la mielina són els oligodendròcits però es requereix del funcionament conjunt amb els astròcits i les neurones per al bon manteniment d'aquesta. Els astròcits s'han relacionat amb el manteniment de la substància blanca (Liedtke et al., 1996) i estan afectats en el cas d'algunes leucodistrofies, per exemple la malaltia d'Alexander (Sen and Levison, 2006), VWM i MLC.

1.3 LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS: MLC

L'any 1991, un neuròleg de Bombai va presentar les característiques clíniques d'un grup 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 principal de la presència de quists a nivell subcortical. Degut al tipus de transmissió genètica, es va proposar que la malaltia presentava un patró d'herència autosòmic recessiu.

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.

1.3.1 Característiques clíniques de la malaltia

A partir de l'any 1995, diferents investigadors (van der Knaap et al., 1995a, 1995b; Singhal et al., 1996; Topcu et al., 1998) van proposar un quadre clínic per a la malaltia MLC, basat en aspectes clínics i en l'anàlisi de neuroimatge (MRI).

Avui dia els criteris principals per al diagnòstic són:

- 1) Macrocefàlia durant els primers anys de vida. Posteriorment, el creixement del cap resulta generalment normal, arribant a una línia paral·lela al percentil 98.
- 2) En alguns casos no s'observa deteriorament neurològic i si n'hi ha acostuma a ser lent.
- 3) Encèfal atrofiat i inflat. Es mostra la substància blanca anormalment difusa.
- 4) En estructures centrals, com són el cos callós, la càpsula interna i el tronc cerebral, la substància blanca es troba més conservada tot i que la seva integritat no és total. També s'observa aquesta preservació a les regions subcorticals i preentriculars de la zona occipital del cervell.

5) Presència de quists subcorticals principalment a la regió anterior-temporal.

6) La substància gris es manté intacta sense mostrar cap tipus d'anormalitat.

7) Al llarg del desenvolupament de la malaltia hi ha presència d'atròfia cerebral continua en alguns casos i en altres es pot arribar a normalitzar.

8) 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. La majoria dels pacients acaben necessitant cadira de rodes.

Tot i que la malaltia MLC presenta un fenotip característic, existeix una gran variabilitat en les manifestacions clíniques entre els diferents pacients, fins i tot si pertanyen a la mateixa família (Blattner et al., 2003). Aquesta heterogeneïtat clínica indica que segurament existeixen factors genètics i/o ambientals que influeixen en la severitat de la malaltia.

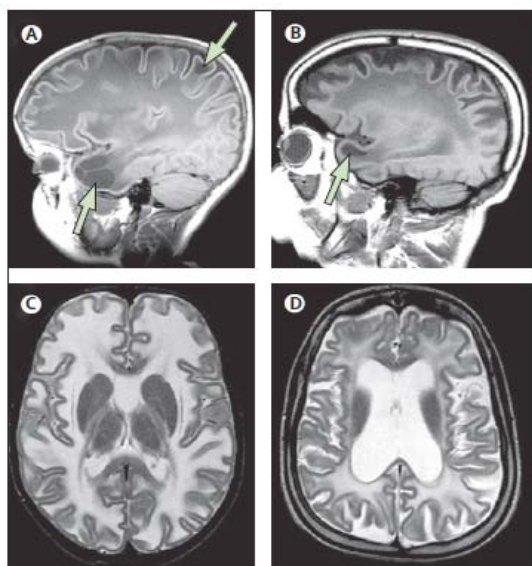


Figura 1. Imatges de MRI corresponents a pacients de MLC. A) i B) Imatges de MRI de dos pacients a les edats de 6 (A i C) i 30 anys (B i D) amb MLC on s'observa la presència de quists a nivell fronto-parietal i anterior-temporal (fletxes). C) i D) Imatges de MRI de dos pacients amb MLC on s'observa la substància blanca difusa. (A i B: vistes sagitals; C i D: vistes axials). Imatge extreta de (van der Knaap et al., 2012).

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. Aquest fet suggereix que hi ha una acumulació d'aigua en el cervell (Brockmann et al., 2003; Sener, 2003).

Estudis histopatològics a partir de la biòpsia d'una pacient, van mostrar una degeneració esponjiforme de la substància blanca i la presència de vacuoles a les capes més externes de la mielina, mantenint intactes les capes més internes (van der Knaap et al., 1996). La majoria de les 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 dels oligodendròcits. El fet que les vacuoles només es trobin en les capes més externes de la mielina fa pensar que no danya en excés la transmissió de l'impuls nerviós.

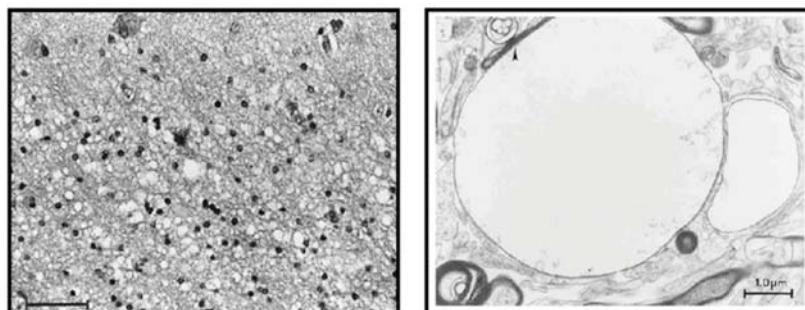


Figura 2. Microfotografies que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca d'un pacient amb MLC. L'imatge de la dreta representa una vacuola observada en les làmines més externes de la mielina (van der Knaap et al., 1996).

L'any 2010 es va realitzar un estudi a un grup de 160 pacients dels quals 54 no presentaven mutacions en el gen *MLC*. Mitjançant MRI es va observar que alguns pacients presentaven característiques fenotípiques diferents (van der Knaap et al., 2010). Tot i manifestar el quadre clínic de MLC els primers anys de vida, aquest millorava amb el temps. Aquests pacients presentaven macrocefàlia els primers anys de vida, amb un mínim retard i amb les funcions motores normals sense espasticitat ni atàxia. Els pacients amb aquest fenotip no tenen retard mental i si en presenten acostuma a ser de grau baix on es necessita educació especial. En un 50% d'aquest pacients amb dèficit cognitiu s'observen símptomes d'autisme (López-Hernández et al., 2011a).

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 i presenta les característiques clíniques típiques de MLC. El fenotip benigne on remeten les característiques clíniques amb el temps, s'ha anomenat MLC2B.

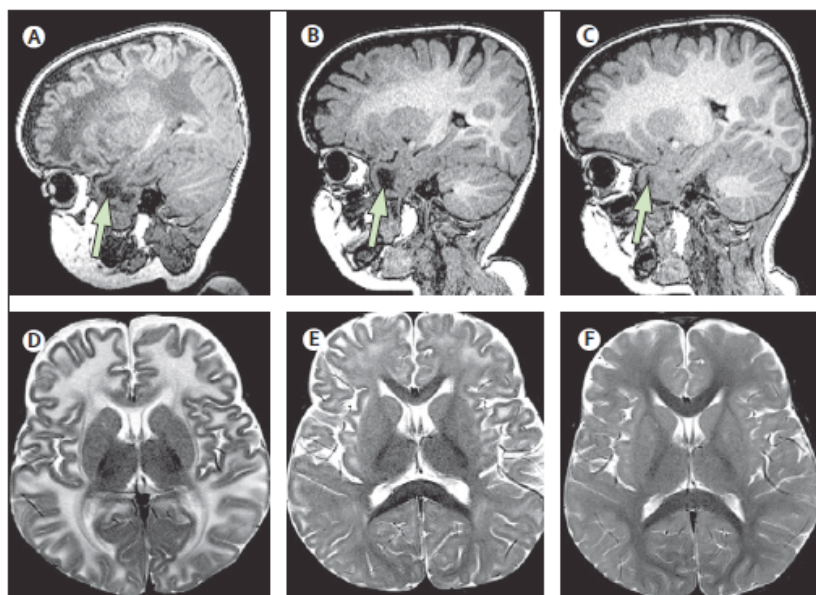


Figura 3. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC amb fenotip benigne. MRI corresponent a un pacient de MLC amb fenotip benigne a les edats de 9 mesos (A i D), 18 mesos (B i E) i 42 mesos (C i F). En A i D s'observen les característiques típiques de MLC, en canvi en B-E i C-F s'observa una millora 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).

Recentment, però, s'ha descrit que pacients que presenten el fenotip clàssic, és a dir que manifesten el fenotip MLC1 o MLC2A, poden mostrar una millora a partir de les imatges de MRI però sense mostrar una millora clínica (Arnedo et al., 2014). No obstant, la confirmació definitiva per a un cert tipus de fenotip ha de ser donada per anàlisis genètiques.

MLC és una malaltia extremadament rara i avui en dia no existeixen estudis sobre l'incidència. Es coneix que la màxima incidència s'ha observat en la població turca (Yiş et al.) i en la comunitat índia dels Argwals (Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 1996). La consanguinitat i l'endogàmia són factors importants per a l'aparició de malalties rares. Els països àrabs acostumen a tenir un major nombre de matrimonis consanguinis. Recentment s'han descrit 6 pacients amb la malaltia MLC en diferents regions d'Egipte (Mahmoud et al., 2014) i anteriorment ja se n'havien descrit d'altres en països com Marroc, Líbia i Tunísia (Koussa et al., 2005; Tinsa et al., 2009).

1.3.2 Genètica de la malaltia

A partir d'estudis de lligament realitzats amb famílies corresponents a una població turca és va trobar un *locus* per a MLC en el cromosoma 22qtel (Topcu et al., 1998). En estudis posteriors, la regió crítica implicada es va reduir gràcies a marcadors microsatèl·lits i

recombinants. Els gens candidats localitzats en la regió crítica van ser seqüenciats en els pacients analitzats, observant mutacions en un gen denominat *KIAA0027* o *WKL1* [MIM604004]. Aquest gen va ser renombrat com *MLC1* ja que era el primer gen implicat en la malaltia (Leegwater et al., 2002).

El gen *MLC1* s'estén al llarg de 26 kb en el cromosoma 22qtel. Aquest gen conté 12 exons dels quals el primer no es codificant i el codó d'inici es troba situat en l'exó 2. S'han descrit dos transcrits alternatius (NM_015166.3 i NM_139292.2) que difereixen en 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 81 mutacions per al gen *MLC1* de les quals 43 són *missense*, 16 són mutacions d'*splicing*, 14 són delecions, 5 són duplicacions, 2 són inserció+deleció i 1 és *nonsense*. Aquestes mutacions estan repartides per tot el gen i s'han trobat tant en homozigosi com en heterozigosi.

La variabilitat fenotípica intrafamiliar observada en pacients que porten la mateixa mutació en *MLC1*, indica que hi ha factors genètics i ambientals que estarien influenciant 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.

El gen *MLC1* només es va trobar mutat en aproximadament el 80% dels pacients (Leegwater et al., 2001a, 2002; Topcu et al., 1998; Yalçinkaya et al., 2003). Els pacients que no presentaven aquest gen mutat tampoc presentaven lligament amb el seu *locus* però si les mateixes característiques clíniques de MLC (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003).

Així doncs, el fet que no tots els pacients presentessin *MLC1* mutat i que s'haguessin descrit dos tipus diferents de fenotips per a la malaltia MLC, indicava l'existència d'heterogeneïtat genètica.

L'any 2010 el nostre grup va realitzar estudis de proteòmica, amb col·laboració amb l'empresa *Logopharm*, per tal d'intentar identificar proteïnes que interaccionessin amb *MLC1*. A partir d'aquests estudis es va obtenir un llistat amb proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de *MLC1*. Les proteïnes escollides per estudiar formaven part de 2 grups diferents: unes eren proteïnes típiques d'unions cel·lulars, ja que *MLC1* es localitza en unions astrocitàries (Duarri et al., 2011), i les altres eren proteïnes amb funció de canal iònic o transportador, ja que el fenotip vacuolitzant que presenten els pacients amb MLC suggeria

que MLC1 podria formar part d'algun complex mediador de la translocació d'ions a través de la membrana cel·lular. Aquestes proteïnes candidates també van ser estudiades en el laboratori mitjançant estudis bioquímics com l'interacció i la colocalització amb MLC1.

Paral·lelament a aquests estudis la Dra. Marjo van der Knaap estava realitzant estudis d'alguns gens candidats (de la llista de proteòmica) en pacients que no presentaven mutacions per *MLC1*. En aquell moment els estudis de proteòmica van mostrar una interacció directa entre les proteïnes MLC1 i GlialCAM. Es van trobar mutacions de GlialCAM en aquells pacients que no presentaven mutacions en MLC1. Així doncs, *GLIALCAM* era el segon gen implicat en la malaltia MLC (López-Hernández et al., 2011a).

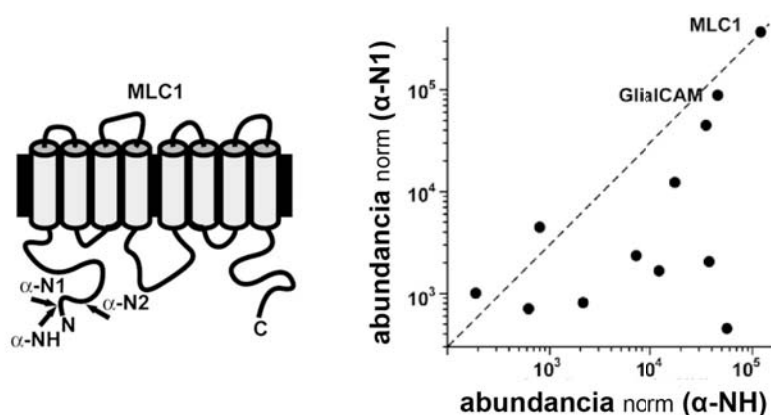


Figura 4. Avaluacions de les diferents purificacions per afinitat amb els diferents anticossos contra la proteïna MLC1 realitzades per Logopharm. Gràfic 2D de les diferents abundàncies de proteïnes determinades per espectrometria de masses després de la coimmunoprecipitació de membranes de cervell de rata i ratolí utilitzant dos anticossos contra MLC1 (N1 i NH) (van der Knaap et al., 2010; López-Hernández et al., 2011a).

El gen *GLIALCAM* (o HEPACAM) [MIM 611642] està localitzat en 11q24.2, 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 19 mutacions diferents en *GLIALCAM*. D'aquestes mutacions, 11 són *missense*, 2 són *delecions*, 1 és *inserció+deleció* i 2 són *nonsense* (Arnedo et al., 2014; van der Knaap et al., 2012). S'ha observat que les mutacions en *GLIALCAM* causen l'aparició dels diferents fenotips, MLC2A o MLC2B. El fenotip MLC2A segueix un patró d'herència autosòmica recessiva i els pacients que el presenten mostren un fenotip clàssic de MLC. En canvi, el fenotip MLC2B, el qual s'anomena fenotip benigne o remitent, segueix un patró d'herència autosòmica dominant i els pacients que el presenten mostren una millora amb el temps, (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*.

1.3.3 La proteïna MLC1

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

Segons prediccions bioinformàtiques, la proteïna 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. Els extrems C-terminal i N-terminal són intracel·lulars (Boor et al., 2005).

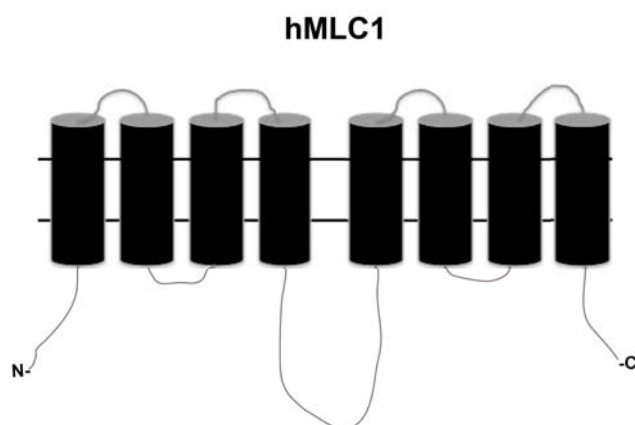


Figura 5. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1, segons prediccions bioinformàtiques. Es mostren els 8 segments transmembrana, 4 *loops* extracel·lulars i 3 *loops* intracel·lulars i els extrems N i C terminals.

El gen *MLC1* no es troba present en tots els fílums animals. Així doncs, la proteïna MLC1 no s'expressa ni en llevats, ni en *Caenorabditis elegans* ni en *Drosophila*, sinó que es comença a expressar en cordats que contenen mielina com el cas del peix zebra.

Realitzant estudis d'alineament entre seqüències de diferents 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.

1.3.3.1 Expressió i localització de la proteïna MLC1

Per tal de definir la localització i l'expressió de la proteïna MLC1, els diferents grups que estudien la malaltia MLC han dut a terme diferents estudis d'immunohistoquímica al llarg d'aquests anys a partir de models astrocitaris, en teixit de ratolí i en teixit humà (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007, 2005; Duarri et al., 2011; Teijido et al., 2004, 2007).

Principalment la proteïna MLC1 es troba en la glia de Bergmann, en el cerebel i en astròcits localitzats al voltant de les regions subpial i perivascular. MLC1 no està present ni en oligodendròcits ni en la microglia. Anteriorment també s'havia descrit que MLC1 s'expressava en neurones (Teijido et al., 2004, 2007). Tot i així, la localització neuronal de MLC1 no havia estat observada en tots els grups que estudien la malaltia. Estudis de microscòpia electrònica d'alta resolució (*immunogold*) realitzats en teixit de ratolí i en teixit humà han demostrat que MLC1 es troba localitzada en unions astrocitàries perivasculars i no en unions entre astròcit i cèl·lula endotelial (Duarri et al., 2011; Teijido et al., 2007).

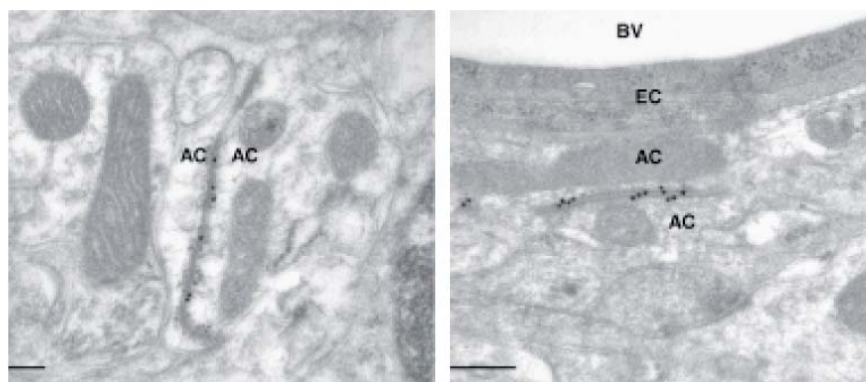


Figura 6. Localització de MLC1 mitjançant microscòpia electrònica. S'observa la proteïna MLC1 localitzada en les unions astrocitàries, tant a zones perivasculars com als processos astroglials, però no es troba en unions en contacte directe amb la làmina basal del vas sanguini. AC: astròcit; EC:cèl·lula endotelial; BV: vas sanguini. Imatge extreta de (Teijido et al., 2007).

Diferents estudis de fraccionament bioquímic, coimmunoprecipitació i microscòpia confocal feien hipotetitzar que MLC1 podia estar associada al complex DG (*dystrophin-glicoprotein*) ja s'havia observat una colocalització de MLC1 i algunes de les proteïnes d'aquest complex en els peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007). Aquesta idea agradava ja que el complex DG és crucial per a l'ancoratge dels canals d'aigua i de K^+ en els peus astrocitaris (Nagelhus et al., 2004a). La desestabilització d'aquest complex pot provocar canvis en la polaritat glial, alteracions de la barrera hematoencefàlica i alteracions en l'homeòstasi d'ions i d'aigua en el cervell (Warth et al.,

2005). Estudis recents del grup realitzats a partir d'*immunogold* en teixit humà, mostren que MLC1 i β -dístroglicà (proteïna localitzada a la membrana astrocitària en contacte amb la làmina basal que forma part del DGC) no colocalitzen, concloent que MLC1 no forma part del complex DG (Duarri et al., 2011).

Per altra banda, estudis realitzats en cultius primaris d'astròcits van mostrar una colocalització de les proteïnes del DGC i MLC1 als compartiments intracel·lulars. En aquests estudis la proteïna MLC1 endògena era detectada de manera difusa en el citoplasma colocalitzant amb marcadors endosomals i del reticle endoplasmàtic (Ambrosini et al., 2008). Estudis posteriors, mostraven que si els cultius primaris d'astròcits eren tractats amb un compost capaç de bloquejar la proliferació cel·lular o de causar diferenciació cel·lular (com es el cas de l'AraC) durant 3 setmanes, aquestes cèl·lules expressaven MLC1 a la membrana cel·lular i en unions astrocitàries (Duarri et al., 2011).

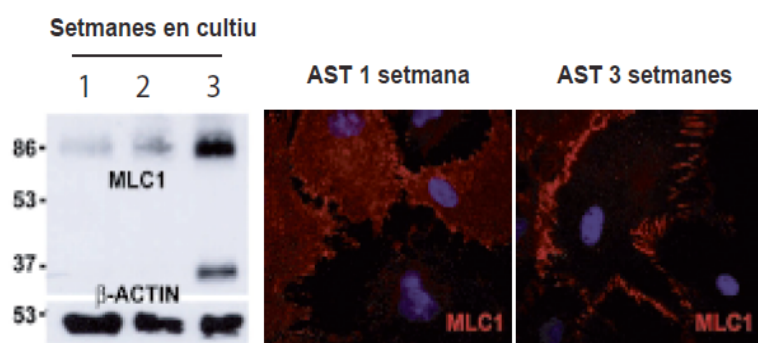


Figura 7. Model cel·lular astrocitàri. Expressió de MLC1 analitzada per WB en astròcits diferenciats a 1, 2 i 3 setmanes de cultiu. Localització de MLC1 mitjançant immunofluorescència en astròcits en cultiu d'1 i 3 setmanes. Imatge modificada de (Duarri et al., 2011)

Aquest model astrocitàri va ser utilitzat com a model de la malaltia ja que reproduïa la mateixa localització de MLC1 *in vivo*. A partir d'aquest model, s'ha descrit que MLC1 colocalitza amb proteïnes components de les unions *tight*, com ZO-1 (*zonula occludens*) i ocludina, i també amb proteïnes de les unions adherents com per exemple β -catenina i N-cadherina (Duarri et al., 2011).

1.3.3.2 Estructura i funció de la proteïna MLC1

A causa de la complexitat i la dificultat per cristal·litzar proteïnes de membrana, l'estructura de MLC1 avui en dia encara es desconeix. MLC1 presenta regions d'homologia interna (Teijido et al., 2004). Els dominis transmembrana de la primera meitat de la proteïna mostren homologia amb la segona meitat. Aquesta homologia entre les dues meitats es mostra de manera més evident en els dominis transmembrana 4 i 8, ja que es caracteritzen per un conjunt de residus leucina. Existeixen evidències bioquímiques que suggereixen que MLC1 forma homo-oligomers ja que la detecció de la proteïna mitjançant 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. A més, la proteïna presenta un lloc putatiu de glicosilació (NPS) entre els segments transmembrana 3 i 4, però s'ha comprovat que no es troba glicosilada (Teijido 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 Serina 27 i per la quinasa C en el residu Serina 339. 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., 2010a). 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 la proteïna MLC1 mostra una baixa homologia amb el canal *Shaker-like voltage-gated potassium channel* (Kv1.1) (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 (Leegwater et al., 2001a; Teijido et al., 2004). No obstant, estudis de *voltage clamp* realitzats amb oòcits de *Xenopus* i en cèl·lules tsA-201 no han pogut confirmar cap d'aquestes hipòtesis (Leegwater et al., 2001a; Teijido et al., 2004).

S'ha observat que la manca de MLC1 en els astròcits provoca vacuolització intracel·lular (Duarri et al., 2011). En els estudis realitzats a partir de la biòpsia del cervell d'un pacient de MLC, només s'havien observat vacuoles a nivell de la mielina (Van der Knaap et al., 1996), ja que no es coneixia la rellevància de la vacuolització astrocitària dels cultius. La reexaminació de la mateixa biòpsia ha permès observar vacuoles en astròcits de la zona perivascular (Figura 8).

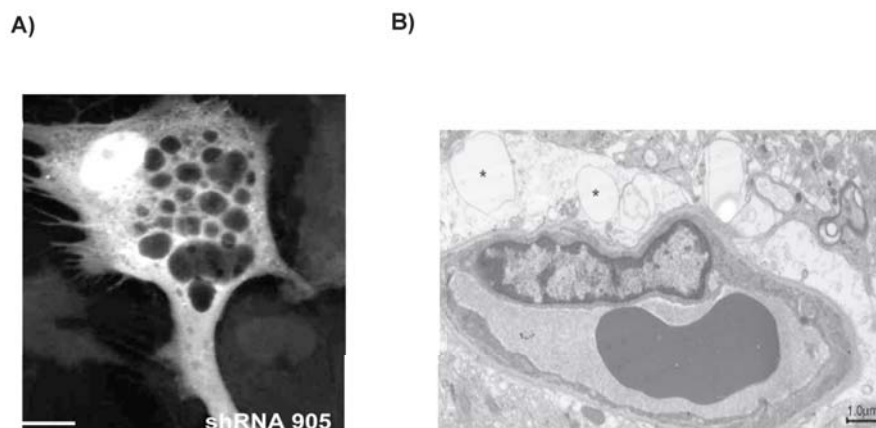


Figura 8. Vacuolització astrocitària. A) Astròcit mancat de MLC1 mitjançant el RNA interferència (sh 905). S'observa una gran quantitat de vacuoles citoplasmàtiques. B) Imatge de microscòpia electrònica del cervell d'un pacient amb MLC. Es mostra la presència de vacuoles en els astròcits perivasculars. Imatge modificada de (Duarri et al., 2011).

Per altra banda, s'ha demostrat que la presència de MLC1 indueix de manera molt baixa l'activitat VRAC (*volume-regulated anion channel*) en cèl·lules HEK i Sf9. Estudis electrofisiològics en línies de limfoblasts procedents de pacients i en astròcits mancats de MLC1 mitjançant RNA d'interferència, mostraven que aquestes cèl·lules tenien una menor activitat VRAC (Ridder et al., 2011, (Capdevila-Nortes et al., 2013). Recentment s'ha descrit que l'entitat molecular que responsable de la regulació d'aquestes corrents és un membre de la família de proteïnes LRRC8, concretament l'isoforma LRRC8A també anomenada SWELL-1 (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014).

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 va acompanyat d'un flux d'aigua en un procés anomenat *Regulatory Volume Decrease* (RVD) (Pasantes-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 bioquímica entre MLC1 i VRAC segueix sent desconeguda.

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 macromolecular associat al canal de potassi Kir4.1, caveolina-1, sintrofina, aquaporina-4, Na^+/K^+ -ATPasa i TRPV4. Aquests resultats indicaven que MLC1 està involucrat en la resposta dels astròcits als canvis de la composició d'ions extracel·lulars i que coopera amb TRPV4 per activar l'entrada de calci en

condicions d'estrès hipoosmòtiques. TRPV4 és un canal de calci que actua com a sensor i en condicions hipoosmòtiques fa augmentar la concentració de calci intracel·lular, essent essencial per l'activació del mecanisme de RVD (Benfenati et al., 2011; Brignone et al., 2011; Lanciotti et al., 2012).

Estudis recents mostren que MLC1 també estaria interaccionant amb la bomba V-ATPasa, encarregada de l'acidificació endosomal. Aquests resultats suggereixen que MLC1 podria estar involucrat en la regulació de l'acidesa dels orgànuls, possiblement per la limitació de l'acidificació de les vesícules (Brignone et al., 2014).

El fenotip vacuolitzant que presenten els pacients de MLC i els resultats obtinguts fins al moment suggereixen que MLC1 ha de tenir un paper en el flux d'aigua o d'ions a través de la membrana. Tot i així la funció de la proteïna continua essent desconeguda.

1.3.3.3 Mutacions del gen *MLC1*

Les mutacions que s'han descrit en pacients amb MLC fins al moment es troben repartides al llarg de tot el gen. Diferents grups han realitzat estudis de les mutacions en sistemes heteròlegs, incorporant aquestes mutacions *missense* mitjançant mutagènesi dirigida. Principalment s'ha observat que la majoria d'aquestes mutacions mostren una disminució en els seus nivells d'expressió i una menor capacitat d'arribada a la membrana plasmàtica en comparació amb la proteïna *wild-type* (Lanciotti et al., 2010b; Teijido et al., 2004). La taula 2 mostra les mutacions en *MLC1* descrites en pacients fins al moment.

Zona	Tipus de mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna
Exó 2	Deleció	c.109delC	p.Leu37CysfsX21
Exó 2	Deleció	c.136delT	p.Cys46AlafsX12
Exó 4	Deleció	c.268_422del	p.Cys90_Gln377delins38
Exó 4, 5	Deleció	c.299_423+108del	p.Val100AspfsX39
Exó 5	Deleció	c.324delT	p.Asn110ThrfsX12
Exó 6	Deleció	c.449_455del	p.Leu150ArgfsX9
Exó 6	Deleció	c.514_515delAA	p.Lys172GlufsX8
Exó 7	Deleció	c.594_597delCTCA	p.Tyr198X
Exó 7	Deleció	c.597_597+33del	p.Val200SerfsX4
Exó 10	Deleció	c.793delA	p.Ser265AlafsX20
Exó 10	Deleció	c.849delC	p.Met284X
Exó 11	Deleció	c.907_930del	p.Leu307_Leu314del
Exó 11	Deleció	c.921_926del	p.Leu309_Leu310del
Exó 11, 12	Deleció	c.1059+567 *2192+?del	p.?
Exó 2	Duplicació	c.111_112dupGC	p.Gln38ArgfsX21
Exó 2	Duplicació	c.135dupC	p.Cys46LeufsX34
Exó 5	Duplicació	c.357dupT	p.Ala120CysfsX61
Exó 6	Duplicació	c.456_460dupGGAGC	p.Leu154ArgfsX9
Exó 11	Duplicació	c.927_929dupGCT	p.Leu310dup
Exó 5	Inserció + deleció	c.337_353delinsG	p.Ile113GlyfsX4
Exó 11	Inserció + deleció	c.908_918delinsGCA	p.Val303GlyfsX4
Exó 2	Missense	c.65G>A	p.Arg22Gln
Exó 2	Missense	c.95C>T	p.Ala32Val
Exó 2	Missense	c.178G>A	p.Gly59Gln
Exó 3	Missense	c.206C>T	p.Ser69Leu
Exó 3	Missense	c.218G>A	p.Gly73Glu
Exó 3	Missense	c.235G>A	p.Glu79Lys
Exó 3	Missense	c.238A>G	p.Met80Val
Exó 3	Missense	c.240G>A	p.Met80Ile
Exó 3	Missense	c.249G>T	p.Leu83Phe
Exó 3	Missense	c.250C>T	p.Arg84Cys
Exó 3	Missense	c.251G>A	p.Arg84His
Exó 3	Missense	c.255G>T	p.Cys85Trp
Exó 3	Missense	c.263G>T	p.Gly86Val
Exó 4	Missense	c.274C>T	p.Pro92Ser
Exó 4	Missense	c.278C>T	p.Ser93Leu
Exó 5	Missense	c.353C>G	p.Thr118Arg
Exó 5	Missense	c.353C>T	p.Thr118Met
Exó 5	Missense	c.359C>T	p.Ala120Val
Exó 5	Missense	c.373T>C	p.Cys125Arg
Exó 5	Missense	c.388G>A	p.Gly130Arg
Exó 5	Missense	c.422A>G	p.Asn141Ser
Exó 5	Missense	c.423C>A	p.Asn141Lys
Exó 6	Missense	c.470C>A	p.Ala157Glu
Exó 8	Missense	c.604G>A	p.Glu202Lys
Exó 8	Missense	c.629T>A	p.Val210Asp
Exó 8	Missense	c.634G>A	p.Gly212Arg
Exó 8	Missense	c.635G>A	p.Gly212Glu
Exó 9	Missense	c.733G>C	p.Ala245Pro
Exó 9	Missense	c.736A>C	p.Ser246Arg
Exó 10	Missense	c.806C>A	p.Ser269Tyr
Exó 10	Missense	c.809C>G	p.Pro270Arg
Exó 10	Missense	c.821C>T	p.Thr271Ile
Exó 10	Missense	c.823G>A	p.Ala275Thr
Exó 10	Missense	c.824C>A	p.Ala275Asp
Exó 10	Missense	c.832C>T	p.Tyr278His
Exó 10	Missense	c.839C>T	p.Ser280Leu
Exó 10	Missense	c.880C>T	p.Pro294Ser
Exó 11	Missense	c.959C>A	p.Thr320Lys
Exó 11	Missense	c.976T>C	p.Cys326Arg
Exó 3	Nonsense	c.213C>G	p.Tyr71X
Exó 2	Deleció	c.177+1delG	p.?
Intró 5	Duplicació	c.423+2dup	p.?
Intró 2	Substitució	c.178-10T>A	p.?
Intró 5	Substitució	c.423+6T>C	p.?
Intró 2	Splicing	c.177+1G>T	p.?
Intró 3	Splicing	c.267+1G>C	p.?
Intró 3	Splicing	c.268+1G>A	p.?
Intró 4	Splicing	c.322-1G>A	p.?
Intró 4	Splicing	c.322-2A>G	p.?
Intró 5	Splicing	c.423+1G>A	p.?
Intró 7	Splicing	c.597+1G>A	p.?
Intró 8	Splicing	c.714+1G>A	p.?
Intró 9	Splicing	c.772-1G>C	p.?
Intró 10	Splicing	c.895-1G>C	p.?
Intró 10	Splicing	c.895-2A>G	p.?
Intró 10	Splicing	c.895-226T>G	p.?
Intró 11	Splicing	c.1060-2A>G	p.?

Taula 2. Mutacions del gen *MLC1* identificades en pacients de MLC. Taula adaptada de (van der Knaap et al., 2012).

A més a més, la majoria de les mutacions estudiades mostren un defecte en el plegament i en 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).

1.3.4 La proteïna GlialCAM

El gen *GLIALCAM* codifica per una proteïna anomenada també GlialCAM (Moh et al., 2005). La proteïna humana consta de 416 aminoàcids i el seu pes molecular és troba al voltant de 72 kDa. GlialCAM va ser originalment identificat com un putatiu gen supressor de tumors en fetge humà (Moh et al., 2005)

Diferents treballs han mostrat que GlialCAM és una glicoproteïna transmembrana de tipus I amb una estructura similar a les IgCAMs, com les JAMs (*junctional adhesion molecules*) i les ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecules*) (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005).

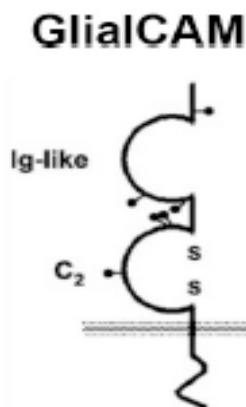


Figura 9. Esquema de l'estructura secundària de GlialCAM. GlialCAM presenta l'estructura típica de les molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines. Conté un fragment extracel·lular que inclou un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim a la regió transmembrana 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).

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 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).

1.3.4.1 Expressió i localització de la proteïna GlialCAM

L'any 2008 es va clonar per primer cop el cDNA de GlialCAM d'una llibreria de cervell humà. Es va observar que GlialCAM es trobava present principalment en sistema nerviós humà i de ratolí, ja que l'expressió en fetge es molt baixa (Favre-Kontula et al., 2008).

Així doncs, GlialCAM es troba a la substància blanca, en les cèl·lules endotelials i en els peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. A més a més, s'ha observat presència de GlialCAM a les regions de contacte entre la mielina i els axons, sobre les capes externes de la mielina (Figura 10 B) i en diferents etapes de maduració dels oligodendròcits (Favre-Kontula et al., 2008; López-Hernández et al., 2011a).

Estudis de localització mitjançant microscòpia electrònica també han mostrat la colocalització de GlialCAM amb MLC1 a les unions astrocitàries (Figura 10 A)(López-Hernández et al., 2011a). Aquesta localització en astròcits depèn del citoesquelet d'actina, ja que un dany en els microrfilaments d'actina afecta a la localització de GlialCAM (Duarri et al., 2011; Moh et al., 2009)

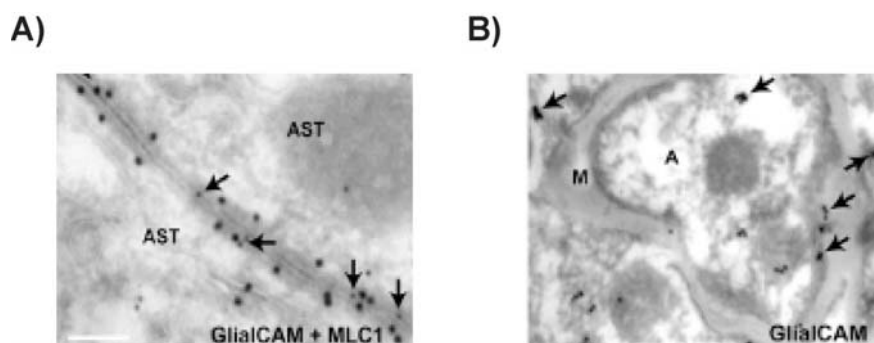


Figura 10. Imatges de microscòpia electrònica d'una mostra de teixit cerebral humà. A) Mitjançant una doble *immunogold* s'observa la colocalització entre MLC1 (partícules de 18 nm) i GlialCAM (partícules de 12 nm, fletxes) a les unions entre astròcits. Abreviatures: AST, astròcit. B) Mitjançant *immunogold* s'observa la localització de GlialCAM en els axons, en les regions de contacte de la mielina i els axons i al voltant de la mielina. A: axò; M: mielina. Imatge modificada de (Duarri et al., 2011; López-Hernández et al., 2011a)

No hi ha estudis realitzats sobre la presència de GlialCAM durant el desenvolupament en humans però s'ha observat un increment 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 i la formació de la mielina (Favre-Kontula et al., 2008).

A més, estudis realitzats en cultius primaris d'astròcits de rata mostren una localització a la membrana plasmàtica amb una concentració de la proteïna a les regions de contacte entre astròcits (Duarri et al., 2011; 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).

1.3.4.3 Estructura i funció de GlialCAM

Mitjançant estudis de WB, coimmunoprecipitació o amb l'utilització de *cross-linkers* s'ha suggerit que GlialCAM dimeritza formant interaccions homofíliques. 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). Amb aquests resultats es suggereix que aquests *cis*-homodímers podrien ser importants per a les propietats d'adhesió. D'una banda 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

(Capdevila-Nortes et al., 2012; López-Hernández et al., 2011b).

D'altra banda, el domini citoplasmàtic consta de regions riques en prolines que proporciona llocs putatius d'unió a dominis SH3 i possibles llocs de fosforilació de serina/treonina i de tirosines quinases. Aquests 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 específica que GlialCAM desenvolupa en el cervell humà és completament desconeguda. Fins al moment, els estudis realitzats amb GlialCAM sota el nom d'HepaCAM han estat enfocats en el context del càncer (Chung Moh et al., 2005). Tot i així, s'ha observat que la presència de la proteïna és molt baixa o inexistent en diferents teixits tumorals i línies cel·lulars. Estudis realitzats en cèl·lules de glioblastoma humà han mostrat que GlialCAM induïx la diferenciació d'aquestes cèl·lules. Una alta quantitat de la proteïna accelera l'adhesió cel·lular i inhibeix la migració i la proliferació, mentre que una baixa quantitat o un trencament de l'adhesió cel·lular contribueixen a la migració i a la proliferació accelerant la progressió tumoral i la metastasi (Lee et al., 2009; Xun et al., 2010).

El fet de conèixer que *GLIALCAM* era el segon gen de la malaltia va portar a realitzar diferents estudis per tal de poder entendre millor el seu rol en la leucodistrofia MLC. Estudis bioquímics i d'interacció van mostrar que MLC1 i GlialCAM interaccionen de manera directa i que GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1, necessària per al correcte tràfic de MLC1 a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011a, 2011b). En canvi, la localització i l'expressió de GlialCAM són independents de MLC1 ja que per si sola és capaç de localitzar-se en les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011b).

Recentment, estudis de RNA d'interferència han indicat que en absència de GlialCAM, MLC1 disminueix els seus nivells de proteïna i la seva localització es mostra de manera intracel·lular, fet que porta a la disminució de l'activitat VRAC i a la formació de vacuoles intracel·lulars. Mitjançant estudis de complementació, s'ha observat la capacitat de GlialCAM de revertir el fenotip vacuolitzant, de localitzar de nou a MLC1 a les unions astrocitàries i d'activar de nou les corrents VRAC (Capdevila-Nortes et al., 2013).

1.3.4.3 Mutacions del gen *GLIALCAM*

Les mutacions trobades en el gen *GLIALCAM* descrites en pacients amb MLC es localitzen al domini extracel·lular de la proteïna i no al transmembrana o al citoplasmàtic, a excepció de la mutació W263X que provoca la truncació de la proteïna i es troba localitzada al final

del domini transmembrana (López-Hernández et al., 2011a). Cal destacar, que les mutacions amb un patró d'herència dominant es troben acumulades en el domini immunoglobulina IgV de la proteïna, en canvi, les mutacions amb un patró d'herència recessiva es troben repartides per tota la regió extracel·lular (Figura 11).

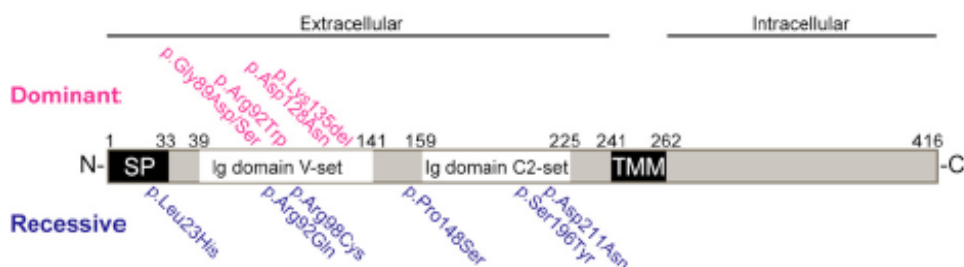


Figura 11. Representació esquemàtica dels dominis de GialCAM i la posició de les mutacions *missense*.

Les mutacions *missense* dominants es mostren en rosa, localitzades al domini IgV, i les recessives, es mostren 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).

S'ha observat que mutacions dominants i recessives de GialCAM poden afectar a la capacitat de la proteïna per homodimeritzar causant defectes en el correcte tràfic a les unions cel·lulars. Aquest defecte en GialCAM causa també un problema en la localització de MLC1, tot i que no s'ha observat un defecte clar d'interacció entre GialCAM-MLC1 (López-Hernández et al., 2011b).

Estudis de localització de les mutacions a nivell cel·lular, mostren que el defecte en el tràfic tant de GialCAM com de MLC1 a les unions cel·lulars provocat per les mutacions recessives pot ser rescatat amb la coexpressió de GialCAM *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).

Estudis recents de complementació mostren que les mutacions en GialCAM 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 (Capdevila-Nortes et al., 2013). Aquests resultats suggereixen que la correcta localització de MLC1 és crítica per a desenvolupar un correcte paper fisiològic.

En la taula 3 es mostren les mutacions del gen *GLIALCAM* identificades en pacients amb MLC.

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	Missense	c.68T>A	p.Leu23His	Recessiva
Exó 2	Missense	c.176G>A	p.Ser59Asn	Dominant
Exó 2	Missense	c.265G>A	p.Gly89Ser	Dominant
Exó 2	Missense	c.266G>A	p.Gly89Asp	Dominant
Exó 2	Missense	c.275G>A	p.Arg92Gln	Recessiva
Exó 2	Missense	c.274C>T	p.Arg92Trp	Dominant
Exó 2	Missense	c.292C>T	p.Arg98Cys	Recessiva
Exó 2	Missense	c.382G>A	p.Asp128Asn§	Dominant
Exó 3	Missense	c.442C>T	p.Pro148Ser	Recessiva
Exó 3	Missense	c.587C>A	p.Ser196Tyr	Recessiva
Exó 3	Missense	c.631G>A	p.Asp211Asn	Recessiva
Exó 2	Nonsense	c.298C>T	p.Arg100X	Recessiva
Exó 4	Nonsense	c.789G>A	p.Trp263X	Recessiva
Exó 2	Missense	c.167 A >C	p.Glu56Pro	Dominant
Exó 2	Missense	c.217C>T	p.Arg73Trp	Recessiva
Exó 2	Nonsense	c.166 C>T	p.Glu56X	Recessiva

Taula 3. Mutacions del gen *GLIALCAM* identificades en pacients de MLC. Taula adaptada de (van der Knaap et al., 2012).

1.4 RELACIÓ DE LA PROTEÏNA CIC-2 AMB LA FISIOPATOLOGIA MLC

Després de descobrir *GLIALCAM* com a segon gen associat a la malaltia i d'observar que no tot GlialCAM està associat a MLC1, el grup es va plantejar utilitzar la mateixa estratègia que va seguir per a trobar proteïnes que interaccionessin amb MLC1. Així doncs, es van realitzar de nou estudis de proteòmica i d'immunoprecipitació mitjançant extractes de membrana de cervells de ratolí i utilitzant dos anticossos contra la proteïna GlialCAM (un monoclonal fet en ratolí i un policlonal fet en conill i purificat en el nostre laboratori). Aquests estudis es van dur a terme un cop més amb col·laboració amb l'empresa *Logopharm*.

Els resultats van mostrar la presència de pèptids corresponents a GlialCAM i a MLC1, tal i com s'esperava, però també es van mostrar pèptids corresponents al canal de Cl⁻ CIC-2 que copurificaven amb GlialCAM (Figura 12). Es van realitzar estudis de WB per tal de verificar que CIC-2 copurificava almenys amb una fracció de GlialCAM (Jeworutzki et al., 2012).

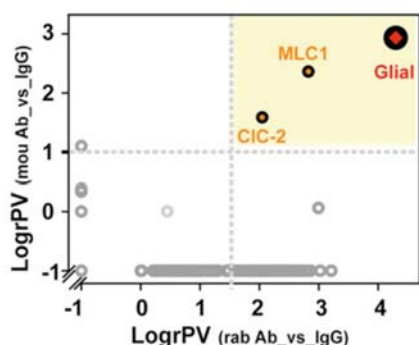


Figura 12. Identificació de CIC-2 com a proteïna associada a l'interactoma de GlialCAM. Avaluació de la purificació per afinitat de GlialCAM en extractes de membrana de cervell de ratolí. Imatge extreta de (Jeworutzki et al., 2012)

1.4.1 La proteïna CIC-2

El canal de Cl⁻ CIC-2 codifica pel gen *CLCN2*. Aquest canal pertany a una família de canals/transportadors formada per 9 membres en mamífers i que es troba altament conservat en l'evolució (Jentsch et al., 2005; Thiemann et al., 1992).

El canal CIC-2 pot ser activat per voltatges de membrana negatius, per inflamació cel·lular, per un augment de la concentració de Cl⁻ intracel·lular i per una lleugera acidificació extracel·lular (Jordt and Jentsch, 1997; Thiemann et al., 1992).

1.4.1.1 Expressió i localització de la proteïna CIC-2

El canal de Cl⁻ CIC-2 es troba àmpliament expressat i de manera obliqua. Es troba a diferents òrgans com l'intestí, l'estómac, glàndules salivars, cor, ronyó i cervell. L'expressió més abundant de CIC-2 es troba en 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). A banda, CIC-2 s'expressa en neurones hipocampals piramidals i en algunes interneurons (Smith et al., 1995).

1.4.1.1 Estructura i funció de la proteïna CLC-2

El canal CIC-2 s'obre lentament en condicions d'hiperpolarització i pot ser activat i modulats per acidificació externa. També és capaç d'activar-se per un canvi de volum cel·lular causat per hipotonicitat (Jentsch et al., 1999; Smith et al., 1995; Zúñiga et al., 2004).

Es pensa que existeixen dos mecanismes d'obertura per al canal: un de ràpid i un de lent (Zúñiga et al., 2004) i s'ha demostrat que la regió C-terminal regula l'obertura de CIC-2

(Garcia-Olivares et al., 2008).

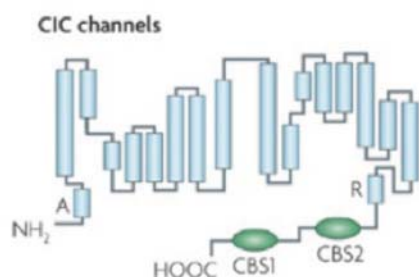


Figura 13. Estructura del canal CIC-2. Aquesta proteïna consta de 18 segments, dels quals la majoria travessen la membrana parcialment. Inclou dos dominis CBS a la part C-terminal. Imatge extreta de (Verkman and Galletta, 2009).

S'ha descrit que l'augment de volum cel·lular produït per condicions d'hiposmolaritat podria ser un dels mecanismes per activar el canal. A banda, s'ha descrit l'importància que podria tenir el canal CIC-2 en l'homeòstasi d'ions i el tamponament de K^+ mitjançant l'unió entre astròcit-oligodendròcit juntament amb Cx47, Cx32, AQP4 i Kir4.1 (Blanz et al., 2007; Jentsch et al., 2002).

S'ha suggerit que aquest canal podria tenir un paper en processos de transport epitelial, en la regulació del volum cel·lular i en el control de la concentració intracel·lular de clorur en neurones mitjançant el receptor GABA (Jentsch et al., 1999; Smith et al., 1995; Zúñiga et al., 2004). Recentment estudis amb *C.elegans* mostren que realment el paper principal del canal CIC-2 seria modular l'entrada d'ions Cl^- i no la sortida (Branicky et al., 2014).

El ratolí *knock-out* de CIC-2 mostra una degeneració severa de la retina a partir d'edats molt primerenques, produint ceguera, i un degeneració testicular produint infertilitat als animals. A banda, en edats avançades s'aprecia la presència de vacuoles espongiformes a les làmines més externes de la mielina (Blanz et al., 2007; Bösl et al., 2001). Aquests animals, però, no mostraven defectes neurològics.

Aquest fenotip que presentava el ratolí *knock-out* de CIC-2 mostrava certa similitud amb el fenotip que presenten els pacients amb MLC. El fet d'interaccionar directament amb GlialCAM, de localitzar-se en la mateixa regió i de mostrar un fenotip vacuolitzant similar feien pensar que el gen *CLCN* podria ser un bon candidat per MLC. Estudis realitzats en pacients amb MLC sense mostrar el gen *MLC1* mutat tampoc han mostrat cap mutació en el gen *CLCN2* (Scheper et al., 2010). Recentment, però, s'han identificat mutacions en aquest gen relacionades amb un tipus de leucoencefalopatia. Els pacients amb aquestes mutacions presenten microvacuolització observades mitjançant MRI i característiques diferents a les que presenten els pacients amb MLC (Depienne et al., 2013). A banda, s'ha suggerit que la pèrdua completa o parcial de la funció de CIC-2 *per se* és insuficient per donar lloc a epilèpsia, contràriament al que s'havia descrit anteriorment (D'Agostino et al., 2004; Saint-Martin et al., 2009).

1.5 TERÀPIA PER ALS PACIENTS AMB MLC

El fet de no conèixer les funcions que desenvolupen les proteïnes MLC1 i GlialCAM, fa difícil entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Per aquest motiu, fins al moment no s'ha pogut desenvolupar cap tractament per als pacients de MLC. Únicament se'ls pot aplicar mètodes pal·liatius dels diferents símptomes que produeix MLC, o bé disminuir la incidència gràcies al diagnòstic prenatal.

2. FISIOLOGIA I FUNCIO ASTROCITÀRIA

2.1 MORFOLOGIA I TIPUS D'ASTRÒCITS

Els astròcits representen un 90% del total de les cèl·lules del SNC i per aquesta raó el seu paper és imprescindible per al correcte funcionament del sistema nerviós. La seva presència més abundant es troba en certes àrees cerebrals com són l'hipocamp i el cerebel (Norenberg, 1979). *In vivo*, presenten una morfologia estrellada, estenent-se entre 5 o 8 processos principals, cada un dels quals ramifica en processos més fins. Aquests processos estan polaritzats en dos dominis funcionals, un on la part més extensa de la membrana s'encara i contacta amb les neurones veïnes i l'altre que es caracteritza per contactar amb els vasos sanguinis (Benarroch, 2005; Nedergaard et al., 2003). Aquests processos, altament ramificats, es caracteritzen per la presència de la proteïna glial àcida fibril·lar (GFAP). Aquesta és una proteïna exclusiva d'aquest tipus cel·lular i la seva expressió augmenta amb el grau de diferenciació astrocitària (Bovolenta et al., 1984). Tot i així, hi ha estudis que demostren que alguns astròcits són negatius per GFAP, principalment en la substància gris (Ogata and Kosaka, 2002).

Els astròcits mostren una morfologia altament complexa, i cada un d'ells ocupa territoris ben definits sense solapar-se amb astròcits veïns. Cada astròcit ocupa el seu propi espai anatòmic, essent aquest el seu domini funcional. La importància funcional de que aquests astròcits no es superposin es desconeix, però una conseqüència notable d'aquesta organització és que totes les sinapsis s'estenen sota l'influència d'un únic astròcit (Nedergaard et al., 2003). Diversos estudis han mostrat que un únic astròcit està amb 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). Els astròcits són cèl·lules estrellades amb llargues prolongacions que formen una xarxa tridimensional. Segons la forma d'aquestes prolongacions es divideixen en dos tipus d'astròcits, protoplasmàtics i fibrosos. Els astròcits protoplasmàtics es troben principalment en la substància gris, presenten molts processos ramificats i estan generats, principalment, per la glia radial en estadis embrionaris de la zona ventricular. Els astròcits fibrosos es troben a la substància blanca, tenen menys processos, més llargs i sense ramificar, i es generen a partir de progenitors neonatals de la zona subventricular (Wang and Bordey, 2008). Existeix una gran heterogeneïtat entre els diferents tipus d'astròcits ja que s'han reconegut nombroses diferències anatòmiques entre astròcits de diferents regions (Hewett, 2009). Estudis d'expressió mitjançant *microarrays* mostren que hi ha pocs gens que realment s'expressin a tots els astròcits, i que segurament es produeixen patrons d'expressió dependents de la localització cel·lular (Bachoo et al., 2004).

Els astròcits estan connectats amb altres astròcits mitjançant unions de tipus *gap*, formant una estructura organitzada de manera de sinciti. Les unions *gap*, formades per proteïnes de la família de les connexines, són permeables a ions i permeten el flux de substrats energètics des dels vasos sanguinis fins a les neurones que es troben en el territori d'un astròcit (Simard et al., 2003).

Cada membrana cel·lular contribueix amb un hemicanal, o connexó, a l'unió *gap* (Abrams and Scherer, 2012; Nualart-Marti et al., 2013; Sargiannidou et al., 2010). Cada connexó està format per 6 connexines organitzades al voltant d'un porus central. Els hemicanals individuals poden estar compostos per un sol tipus de connexina (homomèrics), o per diferents tipus (heteromèrics). Així mateix, les unions *gap* es poden formar per hemicanals iguals (homotípic) o diferents (heterotípic) (Figura 14).

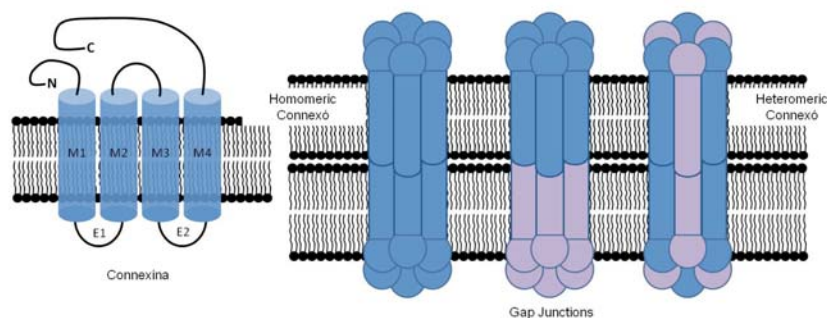


Figura 14. Unions *gap* mitjançant connexines A) Estructura 2D d'una connexina, formada per 4 dominis transmembrana, 2 *loops* extracel·lulars i amb els extrems N-terminal i C-terminal intracel·lulars. B) Representació esquemàtica dels hemicanals o connexons formant una unió entre cèl·lules veïnes mitjançant connexines.

L'obertura de les connexines està altament regulada de diferents maneres, incloent l'obertura pel voltatge transmembrana, la fosforilació i la concentració de Ca^{2+} extracel·lular (Goodenough and Paul, 2009; Lampe and Lau, 2000; Nualart-Marti et al., 2013).

Les unions *gap* són generalment permeables a molècules més petites d'1 kDa com nucleòtids, vitamines, aminoàcids, missatgers secundaris i ions (Sargiannidou et al., 2010). El major constituent d'aquests hemicanals astrocitaris és la connexina 43.

2.2 FISIOLOGIA DELS ASTRÒCITS

Els astròcits desenvolupen diferents funcions a part del seu paper clàssic de suport a les neurones. Aquest tipus cel·lular s'encarreguen del control de l'homeòstasi iònica i de l'aigua

del fluid extracel·lular, de la regulació del metabolisme energètic i de l'activitat sinàptica. A més a més, regulen els nivells de glutamat via transportadors com són GLT-1 (EAAT-2) i GLAST (EAAT-1) en el cas dels astròcits que es troben en la glia de Bergmann, i GABA a les sinapsis. També s'encarreguen de la destoxicació d'amoni, del tamponament de la concentració extracel·lular de potassi i de 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. També 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. Un altre paper molt important que desenvolupen aquest tipus cel·lular es el de protegir a les neurones de l'estrès oxidatiu. A banda, modulen i propaguen les senyals excitatòries en el cervell mitjançant l'alliberació de gliotransmissors (Benarroch, 2005; Blackburn et al., 2009; Oberheim et al., 2006).

Els astròcits tenen un paper dual en un cervell patològic, actuen com a sistema de defensa però al mateix temps poden empitjorar el dany cerebral. Pertorbacions en la comunicació entre glia-neurona poden donar lloc a moltes malalties neurològiques com ara l'isquèmia cerebral, migranya, edema cerebral i moltes altres malalties neurodegeneratives.

MLC1 és una proteïna astrocitària i mutacions en el gen donen lloc a la fisiopatologia MLC fet que produeix una acumulació d'aigua en el cervell dels pacients. També s'ha descrit que hi ha una certa disminució de l'activitat VRAC en astròcits de rata en cultiu en els quals se'ls ha silenciada MLC1 (Capdevila-Nortes et al., 2013; Ridder et al., 2011). Per aquesta raó en els següents apartats es desenvoluparà el paper dels astròcits en la regulació del volum cel·lular, en el tamponament de K^+ extracel·lular i l'importància de la formació de xarxes glials per al correcte manteniment de l'homeòstasi iònica.

2.3 REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR

Les cèl·lules animals tenen un volum específic, definit i caracteritzat per a cada tipus cel·lular. La membrana cel·lular és molt permeable a l'aigua. Per tant, un increment en l'osmolaritat intracel·lular, per exemple durant el transport transepitelial, una acumulació d'osmòlits o un decreixement en l'osmolaritat extracel·lular, poden donar lloc a un ràpid transport d'aigua cap a la direcció necessària per a l'equilibri d'osmòlits, donant lloc a un canvi en el 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.

Segons les condicions en què es troba una cèl·lula, aquesta pot presentar dos tipus d'inflament diferent. En primer lloc, l'inflament hipoosmòtic es dona com a conseqüència de la reducció externa d'osmòlits (condicions hipoosmòtiques del medi extracel·lular), en segon lloc hi ha l'inflament isoosmòtic que es produïx com a conseqüència de canvis en la distribució intracel·lular d'osmòlits en condicions d'osmolaritat externa constant. Aquest segon tipus d'inflament es pot donar en situacions de fallada energètica, com per exemple en cas d'isquèmia o hipòxia. Moltes cèl·lules disposen d'un mecanisme per a la regulació del volum en cas d'inflament hipoosmòtic. Aquest s'anomena *regulatory volume decrease* (RVD) i s'encarrega principalment de la mobilització de diferents soluts acompanyats d'aigua. Els osmòlits encarregats dels reajustament del volum són el K^+ i el Cl^- , ja que són els ions intracel·lulars més abundants, juntament amb molècules orgàniques com per exemple aminoàcids, polialcohols i amines. D'altra banda també es pot donar que hi hagi una disminució del volum cel·lular per hiperosmolaritat del medi extracel·lular donant lloc a un encongiment de la cèl·lula. En aquest cas, les cèl·lules també disposen d'un mecanisme per a la regulació del volum que s'anomena *regulatory volume increase* (RVI). Aquest procés està a càrrec dels cotransportadors $N^+/K^+/Cl^-$ i de transportadors específics d'aminoàcids i polialcohols que actuen d'osmòlits (Jayakumar and Norenberg, 2010; Jayakumar et al., 2011; Kimelberg, 2004; Kimelberg et al., 2006; Pasantés-Morales et al., 2006).

2.3.1 Regulació del volum en els astròcits

Les alteracions de volum en el cervell poden donar lloc a conseqüències dramàtiques. Els límits d'expansió del crani estan limitats per a poder suportar un augment del volum cerebral fet que pot provocar una compressió dels vasos sanguinis i causar episodis d'hipòxia o isquèmia, comprometen la funció i la supervivència neuronal.

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'aquoporines, en aquest cas per l'AQP4. L'AQP4 és un canal d'aigua que es troba localitzat en els peus dels astròcits perivasculars i subpials. El seu extrem C-terminal està ancorat a la α -sintrofina, una proteïna adaptadora associada amb la distrofina, donant lloc a un flux d'aigua bidireccional entre el cervell i la sang (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Així doncs, l'AQP4, juntament amb transportadors i canals iònics, són les molècules implicades en l'augment del volum cel·lular dels astròcits i en el mecanisme RVD.

Estudis *in vitro* de l'exposició dels astròcits a l'hipotonicitat, han mostrat noves idees del mecanisme RVD (Benfenati and Ferroni, 2010). Els autors expliquen aquest procés en tres etapes diferents:

1. Es forma un gradient d'osmolaritat intracel·lular el qual causa un inflament de la cèl·lula, ja que hi ha una entrada d'aigua per difusió passiva mitjançant l'AQP4.
2. L'astròcit capta que hi ha un canvi de volum i genera una cadena de reaccions bioquímiques amb l'objectiu de restablir el volum i l'homeòstasi cel·lular.
3. Els mecanismes efectors d'osmotransducció promouen la sortida d'osmòlits orgànics, inorgànics i aigua, per tal de recuperar el correcte volum cel·lular.

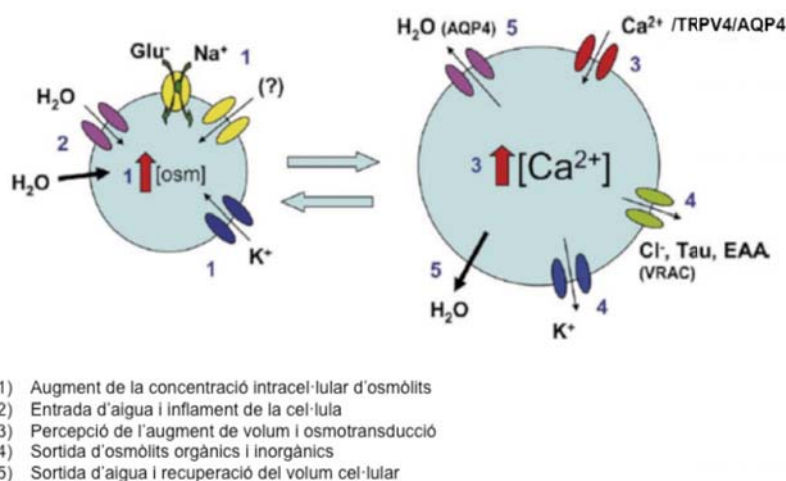


Figura 15 Inflament astroglial i possibles vies de recuperació del volum cel·lular durant el mecanisme RVD. En els peus astrocitaris, el K^+ , el Na^+ i el glutamat són recaptats per l'astròcit mitjançant el canal Kir 4.1, els cotransportadors Na/Glu i poder per algun altre canal catiónic desconegut (1). L'increment de concentració intracel·lular d'osmòlits ve acompanyat per una entrada d'aigua per difusió passiva i pel canal AQP4 (2). El mecanisme que percep l'augment es el RVD (*regulatory volume decrease*). L'augment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular induïda per l'inflament cel·lular podria estar implicat en l'osmotransducció. També s'ha suggerit que el complex TRPV4/AQP4 està implicat en l'osmotransducció (3). El procés RVD es basa en l'extrusió de soluts intracel·lulars juntament amb la sortida d'aigua. Els canals VRAC tenen un paper crític en el mecanisme de RVD, permeten la sortida de Cl^- , taurina (Tau) i aminoàcids excitatòris (EAA) com aspartat i glutamat. També es requereix una sortida de K^+ , però encara no s'ha identificat el canal de K^+ sensible a volum implicat (4). La sortida de soluts crea un gradient per a la sortida d'aigua, permetent la recuperació del volum cel·lular inicial (5). No s'han inclòs bombes i transportadors que contribueixen al moviment d'ions a través de la membrana. Imatge modificada de (Benfenati and Ferroni, 2010).

Fins al moment no està del tot clar quines són les molècules que actuen de sensors i que són capaces de detectar els canvis de volum. Existeixen mecanismes capaços de percebre els canvis que es produeixen en la cèl·lula, com per exemple l'augment intracel·lular de calci induïts per hipotonicitat i canvis en el citoesquelet podrien ser claus per la percepció al canvi de volum (Benfenati and Ferroni, 2010). També s'ha suggerit que altres mecanismes com les proteïnes transmembrana com són les integrines, receptors amb activitat tirosina quinasa (TKRs), receptors acoblats a proteïna-G (GPCRs) o canals de receptors de potencials (TRPCs) (Pasantés-Morales et al., 2006). Els subtipus 1 i 4 dels canals TRPC han estat identificats en cultius d'astròcits i TRPC4 s'ha suggerit que podria colocalitzar amb ZO-1 mitjançant el domini PDZ, el qual estaria controlant la seva localització a la superfície cel·lular (Malarkey et al., 2008; Song et al., 2005).

També s'han relacionat altres canals catiónics no selectius que han sigut identificats com osmo- i mecano-sensibles com el subgrup de la família TRP anomenat TRPV (*transient receptor potential vanilloid related*). Aquests canals responen a una varietat d'estímuls químics i físics, juntament amb alteracions del volum de la cèl·lula. En cèl·lules de mamífers 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 diferents tipus cel·lulars incloent astròcits corticals de rata (Becker et al., 2005, 2009; Benfenati et al., 2007a; Liu et al., 2006; Pan et al., 2008). TRPV4 s'expressa en els peus astrocitaris que es troben en contacte amb els vasos sanguinis (Benfenati et al., 2007a), de la mateixa manera que ho fa AQP4. S'ha suggerit que TRPV4 i AQP4 estarien formant un complex en aquesta localització, el qual tindria un paper fonamental en l'homeòstasi del volum cerebral. Aquest complex estaria funcionant com un 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 and Ferroni, 2010).

Els osmòlits implicats en la regulació del volum són tant ions inorgànics com petites molècules orgàniques, les quals inclouen sucres, aminoàcids, polialcohols i metilamines. Els mecanismes d'entrada i de sortida d'aquestes molècules són els més ràpids per contrarestar el volum. En el mecanisme de RVD 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 i aspartat o

taurina, 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*). Aquesta activitat s'activa en condicions d'hiposmolaritat i en concentracions altes de K^+ i depèn de calmodulina i de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Kimelberg, 2005; 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. En el cas del Cl^- s'ha demostrat que hi ha canals de Cl^- *inwardly rectifying* de la família dels CICs que podrien estar contribuint en l'homeòstasi del volum (Ferroni et al., 1997; Makara, 2003). També existeixen evidències *in vitro* que els canals 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; Pasantés-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 mitjançant siRNA de AQP4 en que es disminueix l'expressió, s'ha observat que l'activitat VRAC també disminueix (Benfenati et al., 2007b). En el cas del K^+ existeixen evidències que el flux d'ions K^+ 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, però encara no existeixen evidències d'aquest mecanisme en altres regions del SNC (Dibaj et al., 2007).

El mecanisme RVI es dona lloc quan hi ha una disminució del volum cel·lular a causa d'hiperosmolaritat. En aquest mecanisme estan implicats els cotransportador NKCC i els intercanviadors Na^+/H^+ i el Cl^-/HCO_3^- . NKCC1 és un transportador que principalment s'ocupa del manteniment intracel·lular de Na^+ , K^+ , i Cl^- . Sempre se li han associat dues funcions importants com són la de contribuir en el mecanisme RVI després d'un xoc hipoosmòtic i la participació en la captació de K^+ de l'espai extracel·lular durant l'activitat neuronal (MacVicar et al., 2002). Recentment, però, s'ha descrit que en hipocamp de rata NKCC1 no contribueix a l'eliminació del K^+ extracel·lular durant l'activitat neuronal, sinó que el contribuent clau sembla ser la $Na^+K^+ATPasa$. Podria ser que els mecanismes fossin diferents en diferents regions (Larsen et al., 2014). 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 el silenciament de

l'expressió mitjançant siRNA, provoca l'atenuació d'aquest augment de volum induït (Jayakumar et al., 2011). S'ha suggerit que bloquejar l'activitat del transportador NKCC1 podria representar una estratègia terapèutica útil per al tractament de les primeres fases del dany cerebral traumàtic.

2.3.1.1. Activitat VRAC i la seva implicació en la regulació del volum astrocitari

Els canals de Cl⁻ activats per un augment de volum cel·lular, també anomenats VRAC, s'activen parcialment sota condicions isosmòtiques, donant lloc a un fons de conductància de Cl⁻ que contribueix a determinar el potencial de membrana i la direcció de la força impulsora per altres sistemes de transport. Depenent del potencial de membrana i d'equilibri del Cl⁻, l'activació de VRAC pot causar tan despolarització com hiperpolarització. Aquests canals es poden activar per hipotonicitat, hipertonicitat, per una reducció de la força iònica intracel·lular, per l'aplicació de *shear stress* i per la GTPγS intracel·lular. Les corrents mitjançant VRAC són moderadament *outwardly rectifying* i presenten una inactivació a potencials positius (Nilius and Droogmans, 2003).

Estudis *in vitro* han suggerit que possiblement els canals aniònics regulats per volum (VRACs) tenen un paper important en la resposta dels astròcits als canvis de volum (Kimmelberg et al., 2006). L'activació d'aquests canals disminueix l'osmolaritat intracel·lular i constitueix una de les principals vies responsables d'activar RVD (Hoffmann et al., 2009; Lang, 2007).

El canal VRAC presenta la següent permeabilitat iònica: SCN⁻ > I⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻ > gluconat. A banda, VRAC proporciona una sortida d'osmòlits orgànics com aminoàcids (glutamat, aspartat, glicina) i polialcohols. VRAC també té certa permeabilitat al lactat i al bicarbonat (Nilius and Droogmans, 2003).

Fins al moment, tot i les controvèrsies, s'han suggerit altres noms per l'activitat VRAC, com VSOR (*volume-sensitive outwardly rectifying anion channel*) i VSOAC (*volume-sensitive organic osmolyte anion channel*) per la capacitat de mostrar una activació variable a potencials positius i per la capacitat de promoure fluxos d'osmòlits orgànics com la taurina (Okada, 1997; Okada et al., 2009).

A banda de tenir un paper important per la regulació del volum, VRAC està implicat en l'exocitosi induïda per inflament cel·lular, per la regulació del cicle cel·lular, en la proliferació, en la migració, en l'apoptosi i en diferents estadis patològics com poden ser l'isquèmia, l'edema cerebral i el càncer (Hoffmann et al., 2009; Moser et al., 1995; Nilius et al., 1997;

Okada et al., 2006, 2009).

Fins al moment s'havien proposat diversos candidats per a la modulació d'aquest tipus de corrents de Cl^- , com per exemple la glicoproteïna-P, CIC-2, CIC-3, pl_{Cl^-} o Bestrofina-1, els quals posteriorment s'han descartat.

Recentment, s'ha descrit la proteïna LRRC8A (o també anomenada AGM5 i SWELL1) com a component essencial per a la modulació de les corrents VRAC (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). La família de proteïnes LRRC8 (*leucine-rich repeat containig 8*) està formada per 5 paralogs trobats en diferents cordats els quals són anomenats LRRC8A, B, C, D i E (Abascal and Zardoya, 2012). Aquesta família de proteïnes va ser descoberta l'any 2003 i fins al moment no es coneixen amb exactitud les seves funcions biològiques (Sawada et al., 2003). Les proteïnes LRRC8 consten de 4 segments transmembrana i un domini amb 17 leucines situat a l'extrem C-terminal. Aquests dominis LRR tenen una estructura en forma d'arc amb una superfície elevada amb relació al volum relatiu de les proteïnes globulars (Kajander et al., 2006). S'ha suggerit que aquestes proteïnes podrien estar involucrades en interacció entre proteïnes gràcies als dominis LRR, en processos d'immunitat innata, en desenvolupament neuronal i en apoptosi (Kobe, 2001; Ng et al., 2011; Padmanabhan et al., 2009; de Wit et al., 2011).

Mitjançant diferents mètodes de comparació de seqüències s'ha descrit que les proteïnes LRRC8 podrien haver-se originat de la combinació evolutiva entre una pannexina i alguna proteïna que contingui el domini LRR. Les pannexines són un grup de proteïnes (Panx 1, 2 i 3) que formen unions *gap* en vertebrats i mostren una baixa homologia amb les innexines, les quals són les encarregades de formar unions de tipus *gap* en invertebrats. Tot i que les pannexines formen hemicanals com les connexines i que Panx1 mostra propietats similars a les connexines, s'ha demostrat mitjançant alineacions, que formen part de famílies de proteïnes clarament diferenciades (Bruzzone et al., 2003; Iglesias et al., 2009; Scemes et al., 2009). S'han trobat moltes insercions i delecions comparant les seqüències de les LRRC8 i les pannexines, però existeixen alguns motius (com per exemple el parell de cisteïnes en els *loops* extracel·lulars) ben conservats en les dues famílies de proteïnes en les regions transmembrana (principalment en el passos transmembrana 1 i 2) i en els *loops* (Abascal and Zardoya, 2012).

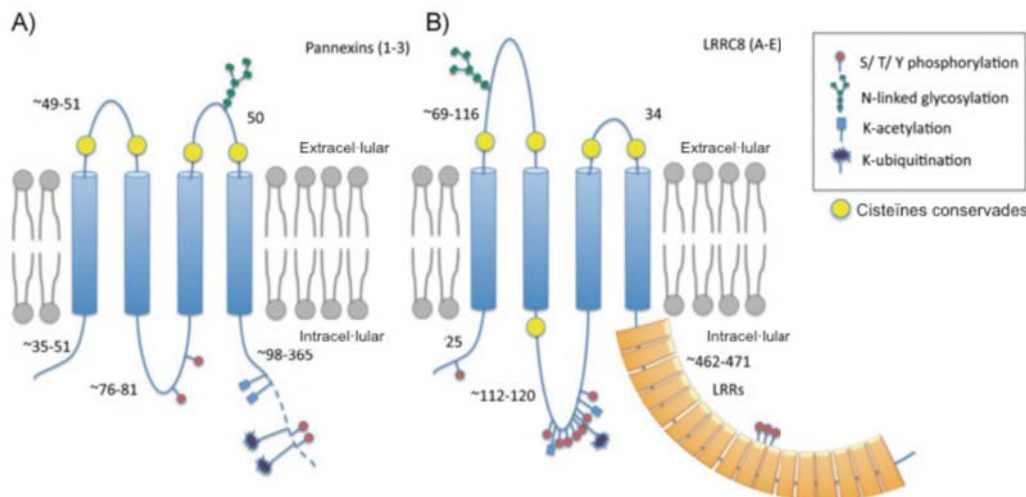


Figura 16. Topologia proposada i modificacions post-traduccionals de les pannexines (A) i de les LRRC8 (B). S'observen les diferents modificacions post-traduccionals (fosforilació, glicosilació, acetilació i ubiquitinació). També s'observen en groc les cisteïnes conservades en els loops extracel·lulars i el domini LRR en taronja, en les proteïnes LRRC8. Imatge modificada de (Abascal and Zardoya, 2012).

S'ha suggerit que les proteïnes LRRC8 podrien estar involucrades en la comunicació cel·lular, especialment en el SNC i en el sistema immune. Mitjançant un patró d'expressió gènica en teixits i en diferents tipus cel·lulars s'observa que els gens *Irrc8a* i *Irrc8d* s'expressen de manera obliqua, *Irrc8b* seria específic del SNC i *Irrc8c* estaria fortament lligat al sistema immune. L'expressió de *Irrc8e* es limitada però augmentaria la seva expressió en alguns tumors (Abascal and Zardoya, 2012). L'abundància de les proteïnes LRRC8 en macròfags i limfòcits podria suggerir el paper d'aquestes proteïnes en l'activació de cèl·lules immunes per senyals d'entrada.

Per tal de poder identificar la molècula que era capaç de modular aquestes corrents es va realitzar un *screening* de siRNA focalitzat en una gran quantitat de gens humans. Es va establir un assaig de fluorescència per hipotonicitat induïda per l'entrada de I^- en cèl·lules HEK (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). Aquests estudis recents mostren que LRRC8A és una proteïna de membrana però quan la proteïna es troba truncada a l'extrem C-terminal dóna lloc a que es quedi retinguda de manera intracel·lular. Aquest cas s'ha donat en un pacient amb agammaglobulinèmia (Sawada et al., 2003).

A part, un dels estudis demostra que mutacions en LRRC8 causen canvis significatius en les propietats del porus, especialment en la selectivitat dels ions I^- respecte el Cl^- . El mateix estudi conclou que LRRC8A és el component essencial de VRAC (Qiu et al., 2014). En canvi, l'altre estudi realitzat explica que per donar lloc a l'activitat VRAC s'hauria de formar

hexàmers de LRRC8A i mínimament alguna de les altres isoformes, essent l'isoforma A la més necessària. En aquest treball també es descriu que LRRC8 depenent de Cl⁻ i de fluxos de taurina indiquen que l'activitat VRAC és la mateixa que l'activitat VSOAC (Voss et al., 2014).

2.4 TAMPONAMENT DEL K⁺ EXTRACEL·LULAR

Els peus astrocitaris mostren una alta conductància específica pels ions K⁺ i particularment es van registrar grans fluxos de K⁺ en aquesta regió astrocitària posterior a una activitat neuronal (Newman et al., 1984; Orkand et al., 1966). Els peus astrocitaris van ser descrits com el punt on es manifesta el punt final d'un procés anomenat "*potassium siphoning*". Aquest mecanisme depèn de l'alta permeabilitat dels astròcits als ions K⁺ i a la presència de la xarxa astrocitària gràcies a la formació d'unions *gap*. El K⁺ és captat per diversos canals i és transporta llargues distàncies, a través de la xarxa d'astròcits, i es alliberat des dels peus astrocitaris fins al capil·lars sanguinis juntament amb aigua (Rash, 2010).

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 (Kofuji and Newman, 2004).

La regulació del K⁺ extracel·lular és vital per al correcte funcionament neuronal. El cervell està preparat per resistir concentracions de K⁺ de 2-3 mM però poden augmentar fins a 10-12 mM després de l'estimulació elèctrica o fins a 80 mM en condicions patològiques (Moghaddam and Adams, 1987).

2.4.1 Tamponament espacial de K⁺ o *potassium siphoning*

S'han descrit diferents canals de K⁺ que s'expressen en astròcits entre els que destaca el canal *inward rectifying* Kir 4.1 ja que s'ha demostrat que en aquest canal es detecta la majoria de la conductància astrocítica (Butt and Kalsi, 2006; Olsen et al., 2006). Aquest canal s'expressa en astròcits, oligodendròcits, en la glia de Bergmann i en la glia de Müller i permet que el moviment de K⁺ sigui bidireccional en funció del gradient de K⁺ transmembrana (Kalsi et al., 2004). 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. Kir 4.1 presenta un motiu PDZ en el seu extrem C-terminal amb el qual pot formar interaccions entre proteïnes que també presentin aquest motiu. Mitjançant aquest motiu, Kir 4.1 colocalitza en els peus astrocitaris amb sintrofina, proteïna

associada al complex glicoproteic associat a distrofina (DGC) (Benfenati and Ferroni, 2010).

En els peus astrocitaris, Kir 4.1 es troba coexpressat amb AQP4. S'havia suggerit que AQP4 podria estar facilitant el moviment d'aigua a través de la membrana, cooperant amb Kir 4.1 amb el moviment de K^+ (Nagelhus et al., 2004b). A banda, també s'ha suggerit que AQP4 d'alguna manera estaria regulant la dinàmica del volum de l'espai extracel·lular en el cervell (Haj-Yasein et al., 2012). L'AQP4 també colocalitza amb les proteïnes formadores del DGC. L'anclatge entre AQP4 i sintrofina sembla ser clau per a que AQP4 pugui portar a terme la seva funció ja que el ratolí *knock-out* de sintrofina mostra pèrdua de la proteïna AQP4 en la membrana perivascular dels peus astrocitaris i els animals mostren un retard en el tamponament de K^+ extracel·lular, fet que provoca una activitat neuronal sostinguda. Aquest animal deficient en sintrofina mostra la proteïna Kir 4.1 i les seves propietats funcionals inalterades, de la mateixa manera que ho fa el *knock-out* de AQP4. Aquests resultats implicarien que Kir 4.1 i AQP4 no presenten una interacció funcional com es pensava (Zhang and Verkman, 2008). Una possible explicació per aquest fet podria ser que aquestes dues proteïnes no pertanyen al mateix microdomini de la membrana plasmàtica. Ja que els astròcits poden ser considerats com una unitat multifuncional, s'ha hipotetitzat que Kir 4.1 podria presentar diferents funcions segons la regió on s'expressi, per exemple podria realitzar un funció característica quan es localitzés en els peus astrocitaris rodejant els vasos sanguinis i una altra quan es localitzés prop de les sinapsis (Benfenati and Ferroni, 2010). Un treball recent mostra que Kir4.1 no presenta un paper predominant en l'absorció del K^+ , tot i que sí que és essencial per a un eficient tamponament d'aquest (Chever et al., 2010).

Per al tamponament espacial de K^+ són molt importants les unions de tipus *gap* ja que gràcies a aquestes connexions hi pot haver un transport d'ions. Els astròcits expressen principalment la Cx43, però també expressen Cx30 i Cx26 (Nagy et al., 2004). L'implicació de les unions *gap* en la modulació de tamponament de K^+ es va mostrar primerament en un treball sobre el doble *knock-out* de Cx30 i Cx43 (Wallraff et al., 2006). 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 RNAi 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 Kir 4.1 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 Kir 4.1 (Menichella et al., 2006).

2.4.2 Absorció de K^+

Fins al moment s'ha descrit que l'absorció del K^+ en les cèl·lules glials es portava a terme a través de la $Na^+K^+ATPasa$ i del cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC1). Aquesta absorció genera un desequilibri de càrregues que s'ha de contrarestar principalment amb l'entrada d'ions Cl^- . Aquesta entrada de clorur es pot donar lloc a partir de canals específics de Cl^- , o recaptant-lo conjuntament amb el K^+ mitjançant el cotransportador NKCC.

L'implicació de la bomba $Na^+K^+ATPasa$ en l'eliminació de l'excés de K^+ en l'espai extracel·lular després d'una activitat neuronal ha estat demostrada (D'Ambrosio et al., 2002; Ransom et al., 2000). S'ha demostrat l'habilitat de la $Na^+K^+ATPasa$ en la regulació de la concentració de K^+ extracel·lular, en que senyals de Ca^{2+} estimulen la bomba i d'aquesta manera disminueix la concentració extracel·lular de K^+ (Wang et al., 2012). Recentment s'ha descrit que la $Na^+K^+ATPasa$ es el mecanisme molecular principal de l'eliminació del K^+ extracel·lular induït per estímuls. També s'ha demostrat el rol de les isoformes $\alpha 2/\alpha 3$ en la recuperació de la concentració de K^+ extracel·lular posterior a un estímulo. En els experiments realitzats s'ha mostrat que l'inhibició de les tres isoformes α de la $Na^+K^+ATPasa$ compromet la viabilitat de les llesques d'hipocamp (Larsen et al., 2014). A banda aquests experiments han mostrat que el cotransportador NKCC1 no contribueix a l'eliminació del K^+ extracel·lular després d'una activitat neuronal en l'hipocamp. NKCC1 es troba altament expressat en astròcits en cultiu (Larsen et al., 2014; Su et al., 2002a, 2002b) però la proteïna es troba absent en teixit de rata (Clayton et al., 1998; Plotkin et al., 1997). Podria ser que en condicions patològiques com l'epilèpsia, edema o infart cerebral NKCC1 estigues sobre regulat i aquest fet fes que tingués una contribució en l'homeòstasi de l'aigua i del K^+ (Larsen et al., 2014).

2.5 FORMACIÓ DE XARXES GLIALS

Les cèl·lules glials s'uneixen a altres per constituir una xarxa que primerament va ser anomenada "sinciti panglial" (Nagy and Rash). Les cèl·lules glials que componen aquesta xarxa són principalment els astròcits i els oligodendròcits. Aquestes cèl·lules glials estan interconnectades a través d'unions *gap* (Fischer and Kettenmann, 1985; Nedergaard et al., 2003). Aquest tipus de xarxes, especialment la que es troba formada per astròcits i oligodendròcits, s'estén de forma radial des del canal espinal i els ventricles cerebrals fins la glia que envolta l'epiteli vascular, passant per regions de la substància blanca i gris (Rash, 2010; Rash et al., 1997). Tot i les controvèrsies, alguns autors han suggerit que els astròcits

podrien establir comunicació directa amb les neurones mitjançant canals intracel·lulars, a partir de la qual podrien proporcionar algun altre mecanisme per a la regulació glial durant l'activitat neuronal (Alvarez-Maubecin et al., 2000; Nedergaard, 1994).

Aquesta xarxa glial 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).

Els astròcits expressen tres tipus de connexines, la Cx43, que és la més freqüent, la Cx30 i la Cx26 (Giaume and Venance, 1995; Nagy et al., 2004). Aquests tres tipus de connexines mostren diferents patrons d'expressió (Altevogt and Paul, 2004). Les unions *gap* entre astròcits solen ser homomèriques, compostes per Cx43/Cx43, les quals es solen trobar tant en la substància gris com en la blanca, i Cx30/Cx30 les quals predominen en la substància blanca (Altevogt and Paul, 2004; Rash et al., 2001).

En els oligodendròcits es troben les següents connexines, Cx47, Cx32 i Cx29. Tot i que poden formar unions *gap* entre oligodendròcits, aquestes connexines principalment formen unions entre oligodendròcits i astròcits. Les unions heterotípiques que es formen són la Cx43/Cx47 i Cx30/Cx32 (Abrams and Scherer, 2012; Sargiannidou et al., 2010). Estudis recents mostren la possible unió *gap* entre oligodendròcits en la regió del cos callós (Maglione et al., 2010; Wasseff and Scherer, 2011). Aquestes unions *gap* heteròlogues es donen lloc a la superfície externa de la mielina, en els *loops* paranodals invertits, en els somes oligodendròcits i en els processos d'aquests oligodendròcits que s'enllacen amb la mielina (Rash, 2010). La Cx32 s'expressa principalment en les fibres mielinitzades de la substància blanca, justament en els paranodes que rodegen els nòduls de Ranvier, formant unions *gap* dins la beina de mielina. La Cx47 s'expressa principalment en els oligodendròcits, principalment al voltant del cos cel·lular (Altevogt and Paul, 2004).

L'importància funcional de les connexines es demostra amb els diferents models animals. El ratolí *knock-out* de Cx43/Cx30 és letal a estadis embrionaris i el doble *knock-out* Cx32/Cx47 i Cx47 mostren vacuolització a nivells de la mielina, principalment el doble *knock-out* ja que la vacuolització s'observa a partir del dia postnatal 13 (Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003). Mutacions en els gens que codifiquen per diferents connexines també donen lloc a diferents malalties com per exemple el cas de la malaltia Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X en què es troba mutada la Cx32 (Yum et al., 2002).

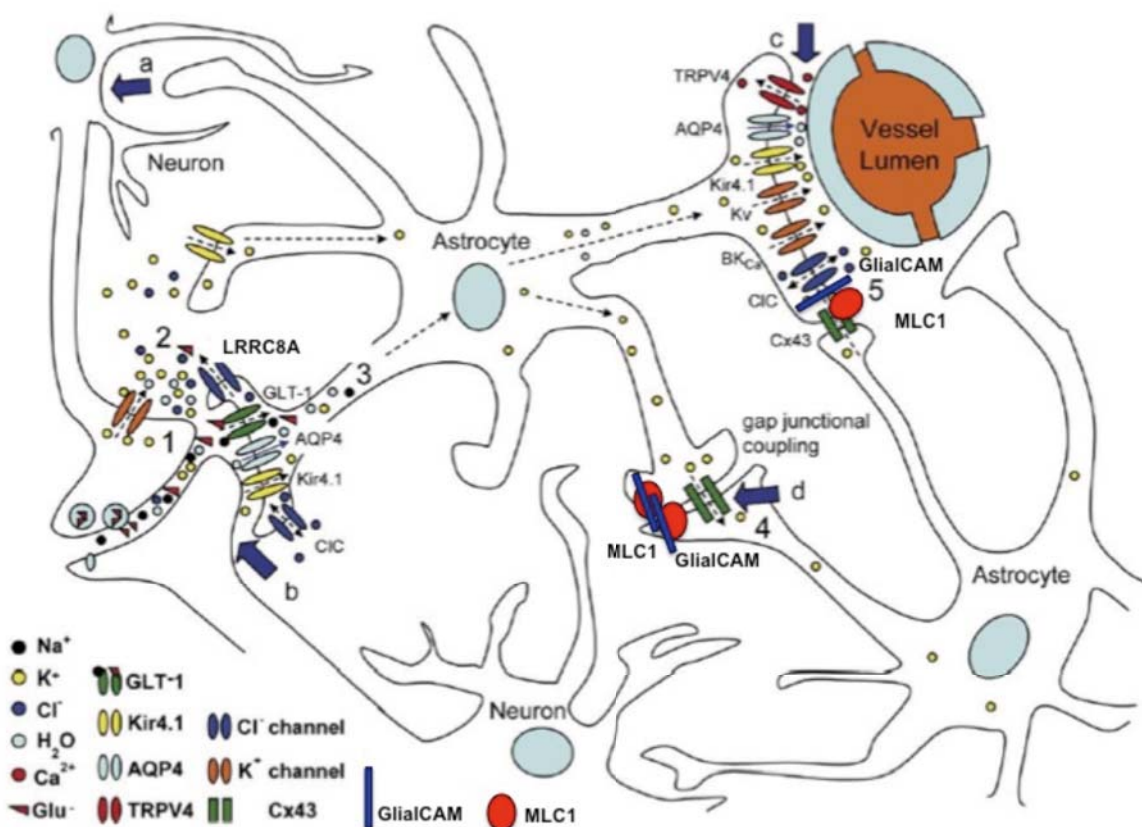


Figura 17. Resum dels mecanismes astroglials implicats en l'homeòstasi extracel·lular. La morfologia astrocitària en el cervell es caracteritza per un cos cel·lular irregular que genera diferents processos. Aquests processos poden contactar amb el soma neuronal (a), envoltar les sinapsis (b) o envoltar 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 per al 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 astrocitària 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 ClC en aquest procés encara no està clara. Per altra banda, les proteïnes LRRC8 modulen l'activitat VRAC contribuint 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. S'han incorporat la localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM al costat del canal de Cl⁻ en el cas dels peus astrocitaris que es troben situats al voltant dels vasos sanguinis i formant unions entre astròcit i astròcit. Imatge modificada de (Benfenati and Ferroni, 2010).

3. MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE MALALTIES DE LA MIELINA

Les malalties neurodegeneratives són causades per la pèrdua de l'estructura i funció de les neurones. Aquest tipus de malalties poden ser desencadenades per una degeneració de la població neuronal o indirectament per una alteració en les cèl·lules gials, com es el cas de la leucodistròfia MLC.

Els models animals per a l'estudi de malalties neurodegeneratives existeixen des de la dècada dels 50, en què per primer cop es va utilitzar la reserpina per disminuir la dopamina i d'aquesta manera obtenir un fenotip similar al que s'observa en la malaltia de Parkinson (Carlsson et al., 1957). En les següents dècades bàsicament s'utilitzaven toxines com la 6-hidroxidopamina, kainat i quinolanat per generar lesions en diferents regions del cervell i d'aquest manera imitar diferents tipus de malalties (Schwarcz and Coyle, 1977; Schwarcz and Köhler, 1983; Ungerstedt, 1968). El model animal més utilitzat fins a la dècada dels 90 va ser el ratolí.

L'importància dels models animals com a eina per a la recerca ha canviat dràsticament les darreres dues dècades a causa de l'identificació de nous gens involucrats en les malalties i ha permès la generació de nous models (Young, 2009). Gràcies a les eines moleculars desenvolupades en els darrers anys s'ha aconseguit generar animals transgènics que expressin una mutació concreta i la generació de models *knock-out* i *knock-in*. Un model animals concret per a un estudi concret es selecciona per la seva similitud amb la malaltia en quan a fisiologia, genètica i anatomia.

Per a l'estudi de malalties neurodegeneratives avui en dia, a banda dels models de ratolí (*Mus musculus*) i de rata (*Rattus norvegicus*), existeixen models de cèl·lules, llevat, mosca (*Drosophila*), cuc (*Caenorhabditis elegans*) i peix zebra (*Danio rerio*). Altres models de malaltia, els quals només s'utilitzen en malalties concretes són el conill (*Oryctolagus cuniculus*), el porc (*Sus domestica*) i el mono (*Macaca mulatta*).

En la present Tesi s'han utilitzat dos models animals *knock-out* per a l'estudi de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals. En els següents apartats es desenvoluparan les característiques principals dels models animals que s'han desenvolupat fins al moment per a l'estudi d'algunes leucodistròfies.

3.1 GENERACIÓ DE MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LES LEUCODISTRÒFIES

El ratolí va ser el primer organisme disponible en l'utilització de la tecnologia de la transgènesis i del “*gene targeting*” (Young, 2009). Tot i els notables avenços amb altres espècies com a models animals de malalties, el ratolí continua essent avui en dia el més utilitzat per a l'estudi de les malalties neurodegeneratives. L'esquema de desenvolupament que segueixen humans i ratolins és bastant similar i existeixen moltes relacions al llarg del genoma. Fins al moment s'havia descrit que el model de ratolí era un model que suposava un baix cost i que el temps de generació era curta. Avui en dia, els nous models com *Drosophila*, el peix zebra o *C.elegans* desbanquen aquestes teories ja que són models més senzills, més ràpids de generar i més barats.

Les leucodistròfies són desordres de la mielina que afecten la substància blanca del SNC amb o sense dany en la mielina del SNP. Durant els últims anys s'han anat desenvolupant models animals per tal d'estudiar aquestes malalties i poder avançar en la seva recerca.

3.1.1 *Vanishing White Matter (VWM)*

El factor d'iniciació de la traducció eucariota 2B (eIF2B) és el component principal de la maquinària de traducció. Aquest factor regula el ràtio de la síntesi proteica sota condicions normals i d'estrès (Geva et al., 2010). A més és el factor encarregat de l'intercanvi de nucleòtids de guanina del factor d'iniciació de la traducció 2 (eIF2). Sota condicions d'estrès la subunitat- α del factor eIF2 es fosforila per una quinasa, convertint el factor eIF2 en un inhibidor del factor eIF2B i donant lloc a l'inhibició global de la síntesi proteica (Dever, 2002). Mutacions en una de les cinc subunitats de *EIF2B* donen lloc a malalties neurodegeneratives principalment afectant la substància blanca del SNC (Leegwater et al., 2001b).

La forma clàssica de la malaltia de VWM esta associada amb una progressiva pèrdua de la mielina del SNC conduint a dèficits neurològics i cognitius. Les imatges de MRI acostumen a mostrar en els pacients una degeneració de la substància blanca (van der Knaap et al., 2006; Schiffmann and Elroy-Stein, 2006).

Fins a l'any 2010 no es va descriure el primer model animal d'aquesta malaltia. Es va generar una soca mutant de ratolí mitjançant l'introducció d'una mutació en un lloc específic del locus del gen que codifica per la subunitat α de eIF2B. La mutació generada en el ratolí, R132H equival a la mutació R136H en humans, associada a la forma clàssica de la malaltia (Geva et al., 2010).

Els símptomes que presenta el model de VWM són similars als que s'observen en una etapa avançada en els pacients que presenten l'al·lel hipomòrfic *EIF2B* amb mutacions lleus. El fenotip que presenta consta d'alteracions en les funcions motores amb la participació del cos callós, la càpsula interna i els axons. A banda, el ratolí en edats primerenques mostra una clara abundància d'oligodendròcits i una reducció en el nombre d'astròcits similar al que s'observa en els pacients. En la malaltia de VWM l'afectació de la substància blanca es presenta en els hemisferis cerebrals, en canvi el ratolí mutant mostra certa afectació en altres regions. Tot i així, el ratolí mutant mostra un fenotip molt més lleu similar al que s'observa en humans en etapes inicials de la malaltia. Imatges de MRI mostren un retard en el desenvolupament del CNS i els coeficients de difusió es troben incrementats en edat adulta. També s'han realitzat estudis de microscòpia electrònica en que s'observa una clara desmielinització en els ratolí mutant en edat adultes indicant que hi ha un procés degeneratiu. Un altre experiment que mostra la desmielinització es el contingut anormal d'una proteïna típica de mielina, PLP, en l'hipocamp. Mitjançant estudis d'immunohistoquímica s'ha detectat una abundància d'oligodendròcits positius per NG2, fet que podria suposar un retard en el procés de maduració de les cèl·lules cap a oligodendròcits madurs per tal de formar la mielina. Els autors creuen que el fet de que el ratolí mutant mostri un fenotip més lleu al que mostren els pacients podria ser degut a l'estrès ambiental, ja que en humans s'ha relacionat com a senyal d'identitat de les malalties de la substància blanca relacionades amb *eIF2B*. Per aquesta raó, se'ls va realitzar un estudi de desmielinització mitjançant una dieta amb *Cuprizone*. Aquest compost és un quelant de coure que fa que hi hagi desmielinització tòxica. Quan el compost s'elimina de la dieta s'observa la capacitat de remielinitzar de l'animal (Torkildsen et al., 2008). Quan s'elimina el *Cuprizone* de la dieta el ratolí mutant mostra una tardana remielinització i el cos callós mostra un augment en l'astroglíosis en resposta a l'efecte del *Cuprizone* (Geva et al., 2010).

Resultats recents d'un estudi d'expressió gènica mitjançant *microarrays* i RT-PCR mostren principalment que gens associats al cicle cel·lular i gens específics de la substància blanca a P1 i P3 estan desregulats donant lloc a un retard en el desenvolupament. També mostren que el gen *Comt1*, responsable de metabolitzar la catecolamina es troba desregulat, de la mateixa manera que en humans, fet que dona una generació defectiva d'astròcits. A banda, gens relacionat amb la resposta a estrès es troben sobrerregulats i altres desregulats (Marom et al., 2011). Tots aquest resultats indiquen que la severitat de la malaltia VWM segurament ve donada per la complexitat de més d'un gen, no només per *EIF2B*.

3.1.2 Malaltia d'Alexander (ALX)

La malaltia d'Alexander va ser descrita per primer cop l'any 1949 en un infant que presentava hidrocefàlia i retard mental, i en l'autòpsia es van descriure unes inclusions d'astròcits anomenades fibres de Rosenthal, que són agregats de proteïnes ubiquitinitzades compostos bàsicament de GFAP, vimentina i proteïnes associades a l'estrès (Iwaki et al., 1989; Messing et al., 1998).

La malaltia d'Alexander és una malaltia rara generada per la presència de mutacions en el gen que codifica per la proteïna GFAP (proteïna acídica fibril·lar glial). Les mutacions semblen actuar de forma que mostren un guany de funció amb un augment d'expressió sobrepasant el llindar tòxic, fet que desemboca en la patofisiologia (Brenner et al., 2001; Messing et al., 2012). Fins al moment un 95% dels pacients mostren mutacions en aquest gen i es desconeixen altres causes que provoquin la malaltia.

La forma clàssica de la malaltia està associada a la presència de macrocefàlia, retard mental, convulsions i espasticitat (Hagemann et al., 2009). La malaltia presentada en l'infància és molt més severa que en l'adolescència i en l'edat adulta.

L'any 1998 es va descriure el primer model de ratolí transgènic per aquesta malaltia en el qual es va sobreexpressar la proteïna hGFAP (Messing et al., 1998). Aquest model principalment mostra que l'acumulació de la proteïna provoca alteracions en la morfologia dels astròcits. Aquesta acumulació de GFAP condueix a una *resposta* d'estrès la qual indueix a l'activació de proteïnes d'estrès (HSP25, HSP70 i α -Bcrystallin) que porten a la generació de les fibres de Rosenthal. Estudis de *microarrays* més recents d'aquest mateix model han mostrat que l'efecte de la sobreexpressió de GFAP genera en l'animal una múltiple resposta a l'estrès a partir de diferents gens involucrats en la destoxicació, en la regulació de ferro, en el metabolisme del glutatió i en la producció de NADPH. Molts d'aquests gens estan regulats pel factor de transcripció Nrf2 el qual es troba elevat a les 3 setmanes d'edat de l'animal. En edats més avançades el ratolí transgènic mostra la presència d'astròcits i microglia reactiva ja que hi ha un considerable increment de l'expressió de l'integrina Mac1, la qual es activada per citoquines donant lloc a hipertrofia. A banda, proteïnes associades als microtúbuls es troben disminuïdes i hi ha una desregulació en gens relacionats amb la neurogènesi, la neurotransmissió i el transport de vesícules com per exemple els receptors GABA i de glutamat, AMPA, NMDA, Vamp2, Snap25 o Gad65 entre altres. El ratolí transgènic també mostra una desregulació d'alguns canals iònics degut a la funció aberrant de la glia i les neurones. Els perfils d'expressió obtinguts suggereixen que la patologia comença amb una resposta a l'estrès en els astròcits fet que condueix a

l'activació de la microglia resultant una pèrdua de neurones i/o una densitat sinàptica (Hagemann et al., 2005).

Posteriorment es van generar dos models *knock-in* per les mutacions R76H i R236H (corresponents a les mutacions R79H i R239H en humans). A edats primerenques tots dos models mostren una alta expressió de GFAP i la presència de la fibres de Rosenthal, però tot i així el ratolí que porta la mutació R236H mostra un fenotip molt més sever respecte a l'hipertrofia dels astròcits, a la resposta a estrés i al pes corporal. Estudis d'immunohistoquímica mitjançant l'utilització de ferrocianur de potassi mostren una acumulació de ferro entre els astròcits i un clar augment de ferritina. Els models *knock-in* mostren menys fibres de Rosenthal que el ratolí transgènic que sobreexpressa GFAP, per aquesta raó i per intensificar l'expressió de la proteïna es va generar l'animal R236H/+;GFAP^{Tg}. Aquest animal mostra una mort prematura i una expressió de GFAP el doble d'incrementada respecte el ratolí transgènic indicant una clara correlació entre la severitat del fenotip i els alts nivell de la proteïna. Cal destacar la disminució del transportador de glutamat, GLT-1, ja que posteriorment també s'ha observat aquesta disminució en un cultiu primari d'astròcits del model R236H/+;GFAP^{Tg} (Sosunov et al., 2013). La disminució de GLT-1 podria posar a les neurones en risc de mort per exitoxicitat (Tian et al., 2010). Els pacients freqüentment mostren atacs d'epilèpsia, utilitzant el model R236H/+;GFAP^{Tg} i mitjançant l'administració d'àcid kainic s'ha mesurat la generació de convulsions que manifesten aquests animals durant un cert temps. L'animal R236H/+;GFAP^{Tg} mostra la producció de més atacs durant tot el temps mesurat i un major dany neuronal respecte el *wild-type* que va disminuint en nombre d'atacs amb el temps (Hagemann et al., 2006). La disminució de GLT-1 podria explicar l'increment de la severitat dels atacs resultant la mort de les neurones piramidals (Tian et al., 2010).

Més recentment també es va generar un ratolí GFAP^{Tg}/Cryab^{-/-} ja que la proteïna α -*Bcrystallin* (Cryab) s'havia descrit que era important per a la formació de les fibres de Rosenthal. Aquest nou model mostra que no es així, tot i que la proteïna sí que es important per mantenir la viabilitat de l'animal GFAP^{Tg}. En el mateix estudi es va generar un model transgènic de Cryab^{Tg} sota el control del promotor GFAP, el qual mostra que amb combinació dels models R236H/+ i GFAP^{Tg}, una menor presència de la fibres de Rosenthal i disminueix la resposta a estrés (Hagemann et al., 2009).

L'any 2012 un altre estudi sobre la malaltia mostrava un altre model animal en què es combinava el model ja descrit GFAP-Nfr2 (Calkins et al., 2010; Vargas et al., 2008) amb l'animal GFAP^{Tg} i el R236H/+. L'estudi mostra principalment que la sobreexpressió de Nfr2

és suficient per disminuir els nivells del transcrits de *Gfap*, els nivells de proteïna i els nivells de fibres de Rosenthal (LaPash Daniels et al., 2012).

Fins al moment no s'han mostrat estudis de comportament amb aquests models animals tot i que es sap que estudis preliminar realitzats pel grup del Dra. Hagemann amb el ratolí R236H/+, mostren indicacions de dèficits en l'aprenentatge (LaPash Daniels et al., 2012).

L'any 2011 es va descriure un model de la malaltia d'Alexander en *Drosophila* (Wang et al., 2011). La versió *wild-type* i mutant de GFAP quan s'expressen en les cèl·lules gials de la mosca mostren un fenotip característic de la malaltia. La mosca mutant a poc temps d'edat presenta convulsions, característica típica que presenten els infants afectats per la malaltia. Neuropatològicament s'observa disfunció i mort glial per apoptosi acompanyada de degeneració de les neurones. A banda, la mosca mutant mostra agregats ens els cossos eosinofílics i unes inclusions allargades amb una alta similitud amb les fibres de Rosenthal. La sobreexpressió de l'homòleg de α -*Bcrystallin* en la mosca mostra millores en els defectes neuropatològics i de comportament en la mosca mutant. Altres vies implicades prèviament en altres model de la malaltia com el transport de glutamat, l'estrès oxidatiu, l'autofàgia i la senyalització JNK semblen jugar un paper important en el model de *Drosophila* (Messing et al., 2012; Wang et al., 2011).

3.1.3 Malaltia de Pelizaues-Merzbacher (PMD)

La malaltia de Pelizaues-Merzbacher és un tipus de leucodistrofia amb herència recessiva lligada al cromosoma X. És una malaltia severa sobretot en edats primerenques. Els pacients acostumen a desenvolupar nistagme (espasme dels músculs motors del globus ocular), poc control del cap, disfunció cerebelar, espasticitat en les extremitats superiors i inferiors i deteriorament cognitiu (Koeppen and Robitaille, 2002; Prukop et al., 2014). Tot i que la progressió de la malaltia pot ser molt variable, aquesta depèn de mutacions en el gen *Plp1*. La proteïna PLP i la seva isoforma DM-20 són proteïnes de membrana de la mielina i representen el 20% del total de les proteïnes en aquesta localització. Les mutacions que es troben en la malaltia poden ser duplicacions o triplicacions del gen (formes greus de la malaltia), deleció del gen sencer (formes lleus de la malaltia), i mutacions puntuals, deleccions o insercions (ampli espectre de la gravetat clínica) (Gruenenfelder et al., 2011).

Per a l'estudi de la malaltia de Pelizaues-Merzbacher s'han descrit diferents models animals. Primerament, l'any 1992 van sorgir els models de ratolí *jimpy* i *msd*. Altres models descrits en la mateixa dècada, són per exemple els que mostren una forma més lleu de la malaltia, el ratolí *rsh* (*rumpshaker*) i el conill *pt* (*paralytic tremor*) (Nadon et al., 1990; Nave et al., 1986;

Schneider et al., 1992) o els models descrits en rates (Boison and Stoffel, 1989; Nadon et al., 1990).

Genotype	Polypeptide encoded	Abnormal motor development	Dysmyelination ⁷ of CNS axons	Abnormal oligodendrocyte death	Myelin structure ⁸	Reference
plp ^{null}	none ⁴	Not detectable	Absent	No	Compacted, condensed IPL, reduced stability	This study
plp ^{neo}	159aa ^{1,4}	Mild	Small caliber	No	Uncompacted ⁹	Boison and Stoffel, 1995
plp ^{sh}	276aa ^{2,5}	Moderate	Small and large caliber		Compacted	Schneider et al., 1992
plp ^{pl}	242aa ^{1,4}	Severe (lethal)	Most axons	Increased	Compacted	Duncan et al., 1989
plp ^{msd}	276aa ^{3,4}				Condensed IPL	Skoff, 1995
plp-transgenic	276aa ⁶				Compacted	Readhead et al., 1994

Taula 4. Resum de les característiques dels principals models de ratolí utilitzats per a l'estudi de Pelizaues-Merzbacher durant la dècada dels 90. Taula extreta de (Klugmann et al., 1997).

Com s'observa en la taula 4, els fenotips que presenten aquests models animals són molt diversos principalment en relació a la desmielinització dels axons en el CNS i en els estudis de comportament. Alguns d'aquests models animals s'han realitzat per integració genòmica a l'atzar de múltiples còpies del gen *Plp1*. Cal destacar també el model descrit en rates de la soca Lewis en que una sobreexpressió d'entre 4-7 còpies del gen genera tremolors, atacs epilèptics i mort prematura en els animals. A banda, s'observa apoptosi en els oligodendròcits madurs, dany en els que es troben en desenvolupament i una severa desmielinització acompanyada de la presència d'astrogliosi i microglia reactiva (Bradl et al., 1999). Un intent de millora del model en rata és el que s'ha generat creuant el PLP-transgènic amb *background* de Lewis amb la soca *wild-type* de Wistar, ja que aquesta soca acostuma a generar més camades i més freqüents. Respecte el model de la soca Lewis no s'observen diferències en les característiques típiques de la malaltia, la deficiència de la mielina o la bioquímica (Mayer et al., 2011). Dins d'aquestes línies els animals homozigots mostren un fenotip hipomielinizant greu amb convulsions i mort prematura, mentre que els animals hemizigots mostren un fenotip tardar lleu (Bradl et al., 1999; Kagawa et al., 1994; Karim et al., 2010; Readhead et al., 1994).

Recentment, s'ha descrit un nou model animal de ratolí anomenat *Plp1 dup* en que se li ha duplicat el gen. El fenotip que presenta és entremig al que s'havia observat en els anterior models homozigots i hemizigots. En aquest model l'augment d'expressió del transcrit s'observa fins a P21, ja que després va recuperant els nivells normals com els del *wild-type*, i els nivells de proteïna es veuen incrementats a P12. Aquests resultats indiquen que possiblement PLP es regula de manera postranscripcional en el cervell d'aquest model. La degeneració de la proteïna s'observa degut a la disminució dels nivells de transcrits i de

proteïna de MBP i CNP. Els animals mostren una degeneració de la mielina lenta fins als 6 mesos d'edat en que el procés s'accelera. El ratolí *Pip1 dup* també mostra vacuoles en el cos callós de la mateixa manera que ho fa el model animal que sobreexpressa la proteïna CNP (Gravel et al., 1996), tot i així els autors no tenen clar que poden representar aquestes vacuoles. La duplicació del gen *Pip1* també afecta els nivells d'altres gens relacionats amb la mielina com alguns factors d'elongació o de mortalitat. Els estudis de comportament mostren diferències significatives entre l'animal *Pip1 dup* i el *wild-type* indicant dèficits en les funcions motores (Clark et al., 2013).

3.1.4 Malaltia de Krabbe o Leucodistròfia de cèl·lules globoides

La malaltia de Krabbe és una malaltia amb un patró d'herència autosòmic recessiu en que es produeix una deficiència de l'enzim Galactocerebrosidase (GALC). GALC és una hidrolasa àcida lisosomal que catalitza l'eliminació de galactosa a galactosilceramida (GalCer), un component principal de la mielina, i d'altres esfingolípid que continguin β -galactosa. L'acumulació de GALC en el SNC és tòxica fet que produeix una degeneració dels oligodendròcits amb una conseqüent desmielinització (Igisu and Suzuki, 1984; Suzuki, 2003).

La malaltia es diagnostica principalment en la infància en què s'observa un desenvolupament retardat, rigidesa en les extremitats i irritació. Mitjançant MRI els pacients mostren la substància blanca difusa i s'observen disfuncions neurològiques severes que moltes vegades condueixen a la mort als 2 anys d'edat (Wenger et al., 2000). Aquesta malaltia s'ha documentat en altres espècies (canina, murina i simis) les quals s'han utilitzat com a models de la malaltia.

El model més utilitzat ha estat el ratolí *twitcher* descrit per primer cop l'any 1980. Aquest ratolí porta associada una mutació, la qual és un canvi d'una guanina per una alanina donant lloc a un codó *stop* (Kobayashi et al., 1980; Sakai et al., 1996). Aquest ratolí presenta una baixa activitat de GALC, mostra tremolors a partir de P10-P15 ja que es produeix una infiltració de macròfags donant lloc a una degradació de la mielina. A partir d'aquest moment comença a disminuir el seu pes i es va deteriorant fins a la mort que normalment és al voltant del dia 40 (Duncan et al., 2011; Luzi et al., 2001; Taniike and Suzuki, 1994). En aquest model també es mostra augmentada la concentració de psicovina (glicoesfingolípid). La psicovina està relacionada amb la degeneració dels oligodendròcits al voltant dels axons. Aquest ratolí és el model que més s'està utilitzant en l'estudi de la malaltia de Krabbe.

L'any 2001 es va generar un ratolí transgènic a partir del ratolí *twitcher* que presentava una mutació (H168C) que en humans dóna lloc a un polimorfisme. Aquest model tot i presentar les característiques típiques de la malaltia que s'havia observat en el ratolí *twitcher* mostra un fenotip més lleu (Luzi et al., 2001).

Recentment, s'ha descrit un model de la malaltia de Krabbe en peix zebra. En aquesta espècie s'han trobat dos ortòlegs del gen *GALC*, *galca* i *galcb*, els quals codifiquen per enzims lisosomals actius a pH àcid. Aquests gens s'expressen durant el desenvolupament del SNC. Mitjançant l'injecció de morfollinos s'han generat models *knock-downs* de cada un dels ortòlegs en que s'ha produït un silenciament transitori del gen diana durant els primers dies del desenvolupament. Aquests animals no mostren alteracions, d'igual manera que s'observa en el ratolí *twitcher* heterozigot i en els pacients heterozigots. També s'ha generat un model doble *knock-down* dels dos ortòlegs. En aquest cas els animals mostren una reducció i una desorganització parcial de la xarxa neuronal i un augment de l'apoptosi durant el desenvolupament del SNC (Zizioli et al., 2014).

3.1.5 Malaltia de Canavan

La malaltia de Canavan està causada per una mutació en el gen de l'aspartociclasa (ASPA) donant un lloc a una deficiència de l'enzim. Aquest enzim es troba altament expressat en oligodendròcits madurs i s'encarrega d'hidrolitzar el *N*-acetilaspargat (NAA) donant com a producte aspartat, el qual participa en la síntesi dels lípids de la mielina, i acetat. NAA té un paper important en el manteniment osmòtic del cervell i en la transmissió d'aspartat. Una deficiència en l'enzim ASPA condueix a una acumulació de NAA en el cervell i en l'orina dels malalts (Matalon and Michals-Matalon, 1999; Surendran et al., 2005).

Les característiques típiques de la malaltia inclouen un retard en el desenvolupament, macrocefàlia, hipotonia i mort prematura. Els infants que desenvolupen aquesta malaltia no tenen capacitat per realitzar accions com asseure's, mantenir l'equilibri, caminar o parlar. Els pacients també mostren espasticitat en temps més avançats de la malaltia (Surendran et al., 2003, 2005).

L'any 1985 es va descriure un tipus de rata (*ratatm*) que mostrava tremolors, formació de vacuoles i una degeneració espongiforme molt similar al que s'havia observat en pacients (Yamada et al., 1985). Aquesta *ratatm* presentava una deleció dins d'una regió crítica en que es troba el gen *ASPA* entre altres. Aquest model ha estat utilitzat en diferents estudis com a model de la malaltia (Kitada et al., 2000; Moffett et al., 2011).

També s'ha descrit un model de ratolí *knock-out* per al gen *ASPA* generat mitjançant la forma clàssica. Aquest model mostra símptomes molt similars als que s'observen en els pacients. Té una deficiència de l'enzim *ASPA* i una alta acumulació de *NAA*. El ratolí també mostra una degeneració espongiforme en la substància blanca del cervell observada mitjançant *MRI* (Matalon and Michals-Matalon, 2000). Estudis més recents amb aquest mateix model *knock-out* mostren una implicació de la malaltia en la medul·la espinal. El ratolí *knock-out* també mostra dificultats sensoriomotrius incloent dificultats per caminar o mantenir-se quiet, un intens dolor i atàxia. La medul·la espinal també presenta vacuoles, principalment en la substància gris. Els estudis de comportament mitjançant el test *Rotarod* mostren la dificultat que té l'animal *knock-out* per mantenir l'equilibri. Aquests fets fan pensar als autors que podria ser deguda per la degeneració dels axons i per la pèrdua progressiva de mielina donant lloc a una mala conducció cap als tractes sensors i motrius (Surendran et al., 2005).

S'han realitzat estudis per tal de restablir l'activitat *ASPA* mitjançant l'injecció d'AAVs (adenoassociats) en que s'observen millores en l'animal *knock-out*, però només en les regions on s'han dut a terme les injeccions (Matalon et al., 2003).

Un altre model animal *knock-out* s'ha aconseguit mitjançant la tècnica d'injecció de *N-etil-N-nitrosurea* en què s'indueix la generació de mutacions diverses en el ratolí. El *knock-out* anomenat *Aspa^{nur7}* mostra la mutació *nonsense* Q193X. Aquesta mutació dona lloc a una truncació de la proteïna en els darrers 120 aminoàcids, dominis que inclou els motius *DCTV* i *VNEAAYY* involucrats en l'activitat catalítica de l'enzim (Traka et al., 2008). Aquest model comparat amb el *ASPA-knock-out* mostra un fenotip més lleu i un temps de vida més llarg. El ratolí *Aspa^{nur7}* també mostra la formació de vacuoles principalment en la substància blanca del cerebel i en les cèl·lules de Purkinje.

Recentment, s'ha descrit un model *knock-in aspa^{lacZ/lacZ}* en què el ratolí expressa el gen *lacZ* sota el control del promotor *ASPA*. Aquest nou model de ratolí mostra un fenotip més lleu a nivell neurològic i histològic respecte al ratolí *knock-out*. A banda, mostra que hi ha certa especificitat pel sexe per la deficiència de *ASPA* ja que les femelles mostren l'activitat locomotora menys afectada que els mascles (Mersmann et al., 2011). Aquestes diferències no s'havien observat en els models de ratolí *knock-out* i *Aspa^{nur7}*, però si un estudi realitzat amb la *ratatm*, que mostra l'activitat locomotora menys afectada en femelles que en mascles (Arun et al., 2010).

3.1.6 X-Adrenoleucodistròfia (X-ALD)

L'adrenoleucodistròfia és una malaltia neurometabòlica rara de caràcter recessiu lligada al cromosoma X en que l'estrès oxidatiu és el principal factor patogènic. És el desordre peroxisomal més freqüent caracteritzat per una progressiva desmielinització, insuficiència adrenal i una acumulació d'àcids grassos de cadena molt llarga ($C \geq 22$) (Ferrer et al., 2010; Fourcade et al., 2008). Aquest trastorn hereditari és causat per mutacions en el gen *ABCD1* (també anomenat *ALD*) que codifica pel transportador peroxisomal d'ATP (ALDP), el qual està involucrat en el transport d'àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFA) i els àcids grassos de cadena llarga acetil-CoA, a l'interior del peroxisoma per tal que siguin degradats (Fourcade et al., 2008; van Roermund et al., 2008).

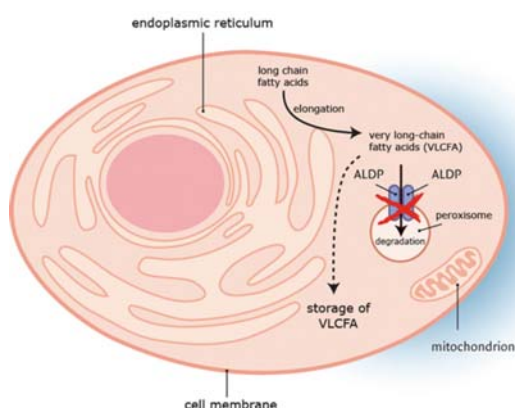


Figura 18. Esquema representatiu de l'acumulació dels VLCFA a la cèl·lula. Els pacients que pateixen X-ALD mostren mutacions en la proteïna ALD fet que impedeix l'entrada dels VLCFA al peroxisoma per a que puguin ser degradats. Imatge extreta de Engelen, Kemp & van Geel: Van gen naar ziekte; X-gebonden adrenoleukodystrofie.

L'any 1997 tres laboratoris diferents van posar a punt el model *knock-out abcd1^{-/-}* mitjançant recombinació homòloga (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997). Aquest ratolí *knock-out* mostra una degeneració tardana de la mielina i axonopatia en la medul·la espinal. Fins als 20 mesos d'edat no s'observa cap tipus de característica patològica. A partir d'aquesta edat els animals mostren alteracions en la mielina, degeneració axonal a la medul·la espinal i en el nervi ciàtic també s'observa atròfia axonal (Pujol, 2002).

En els peroxisomes hi ha 4 gens que codifiquen per transportadors ABC. Fins al moment no s'han descrit malalties humanes que s'atribueixin a defectes a algun dels altres transportadors. Tot i que no es sap les funcions que desenvolupen, la seva homologia amb *abcd1* indica que podrien exercir una funció en el metabolisme peroxisomal dels àcids grassos, principalment *abcd2*, gen que codifica per la proteïna ALDRP (Ferrer et al., 2005). L'inactivació de *abcd2* no condueix a l'acumulació de VLCFA en el sistema nerviós, tot i que la seva sobreexpressió en el ratolí *knock-out abcd1^{-/-}* prevé l'acumulació i de l'inici del fenotip característic (Pujol et al., 2004). La generació del model *knock-out abcd2^{-/-}* mostra que la

seva inactivació genera un fenotip similar al que s'havia observat amb el *knock-out ALD*, on s'observa una degeneració axonal. La generació del doble *knock-out (abcd1^{-/-};abcd2^{-/-})* en canvi mostra un acumulació molt més elevada de VLCFA respecte el *knock-out abcd1^{-/-}*. A banda aquest doble *knock-out* mostra astrogliosi a la medul·la espinal i al cerebel, pèrdua de cèl·lules de Purkinje, atàxia i alteracions ultraestructurals dels mitocondris dels cossos axonals (Ferrer et al., 2005). Aquests treballs van fer plantejar l'estudi de l'oxidació a nivell mitocondrial, ja que en el mitocondri s'acaben de degradar per complet aquests àcids grassos mitjançant el mecanisme de la β -oxidació. Una disfunció mitocondrial caracteritzada per l'estrès oxidatiu i per una insuficiència d'energia provoca una despolarització de la membrana interna mitocondrial conduint a la mort cel·lular. Les modificacions lipooxidatives es comencen a observar a partir dels 3-4 mesos d'edat, molt abans que els signes patològics i neurològics (Fourcade et al., 2008). A banda, estudis locomotors mostren que el doble *knock-out* a partir dels 13 mesos té menys habilitat motora i té problemes per mantenir l'equilibri (Ferrer et al., 2005; López-Erauskin et al., 2012).

Estudis més recents mitjançant el model *knock-out abcd1^{-/-}*, el doble *knock-out* i cultius de fibroblasts de pacients mostren una alta expressió de ciclofilina D (enzim que modula la transició de la permeabilitat mitocondrial). Estudis *in vitro* de la combinació d'antioxidants mostren una disminució de l'expressió de la ciclofilina D i una disminució de l'oxidació en el sistema nerviós, invertint la degeneració axonal (López-Erauskin et al., 2012).

A banda, en aquests models també s'han descrit danys oxidatius afectant enzims de la glicòlisi i una reducció dels nivells de NADPH i ATP a causa d'un error energètic donant lloc a la mort cel·lular, una desregulació del receptor de proliferació del peroxisoma- γ (PPAR- γ) i un deteriorament en les vies dependents del coactivador 1 α (PGC-1 α) (Galino et al., 2011; Morató et al., 2013). Aquests defectes primerencs de la disfunció energètica i del dany oxidatiu, amb una disminució dels nivells de NADPH i ATP, donaria lloc a la degeneració axonal observada en edats avançades del ratolí *knock-out abcd1^{-/-}*. El tractament amb Pioglitazone, el qual és un agonista que s'ha demostrat que es capaç de regular les vies dependents de PGC-1 α , també mostra una millora en els animals normalitzant els marcadors d'estrès, prevenint la degeneració axonal i normalitzant l'habilitat locomotora dels animals *knock-out* (Morató et al., 2013).

3.2 TERÀPIES PER A LES MALALTIES DE LA MIELINA

Avui en dia les estratègies de possibles teràpies per a les leucodistròfies estan bàsicament enfocades a la remielinització en les malalties desmielinitzants. El procés de remielinització

és la resposta natural del sistema nerviós en regenerar els axons que es troben desmielinitzats. En el SNC la remielinització dóna lloc a la síntesi de nous oligodendròcits que conseqüentment formen noves beines de mielina. Aquestes noves beines, tot i que són totalment funcionals acostumen a ser més curtes i més primes (Franklin and Kotter, 2008). La remielinització és important principalment per generar un impuls nerviós més eficient.

Quan es dóna lloc la desmielinització es produeix primerament mort dels oligodendròcits donant lloc a restes de mielina que s'eliminen progressivament per macrofàgs fagocítics. Els astròcits i la microglia detecten la lesió i generen una resposta. La microglia produeix factors que activen els astròcits i els astròcits produeixen factors d'activació de la microglia, generant d'aquesta manera també l'activació de cèl·lules precursors. Aquest és un procés crític en la remielinització, ja que hi ha una sobreexpressió de factors de transcripció necessaris per a la diferenciació de les cèl·lules precursors a oligodendròcits madurs. Una vegada activat aquest procés, aquestes cèl·lules precursors es tornen sensibles a mitògens i a factors quimiotàctics generats per la microglia i els astròcits, i ràpidament poblen la zona desmielinitzada. Aquest procés implica canvis en l'expressió de gens que codifiquen per receptors de la superfície cel·lular (Franklin and Kotter, 2008).

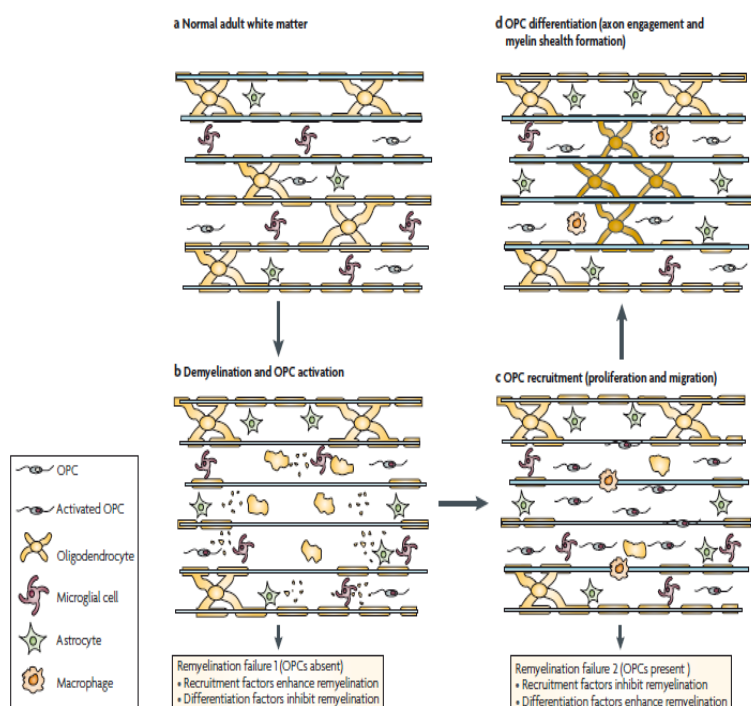


Figura 19. Esquema de les fases de la remielinització. A) La substància blanca normal d'un adult conté astròcits, microglia, cèl·lules precursors (OPCs) i oligodendròcits madurs que formen les beines de mielina. B) Quan hi ha desmielinització s'activen els OPCs i a continuació també s'activen els astròcits i la microglia. C) Els OPCs activats responen a mitògens i a factors quimiotàctics generats pels astròcits i la microglia. D) Diferenciació dels OPCs a oligodendròcits madurs i restabliment de la mielina. Imatge extreta de (Franklin and Ffrench-Constant, 2008).

Els transplants de diferents tipus cel·lulars van ser les primeres teràpies que es van utilitzar durant la dècada dels 80.

En la malaltia de Krabbe primerament s'utilitzava la tècnica del transplant de cèl·lules hematopoiètiques (HCT) la qual resultava beneficiosa si s'aplicava en etapes molt primerenques de la malaltia però l'eficàcia que mostrava era variable segons la severitat de la malaltia (Duffner et al., 2009; Escolar et al., 2005). Recentment s'han descrit diferents mecanismes de teràpia gènica (TG). Aquest tipus de teràpia esta enfocada a l'injecció intracerebral de vectors virals que codifiquen els enzims que falten amb l'objectiu d'establir cèl·lules neuronals que es convertiràn en una font permanent de proteïnes funcinals. Aquesta transferència de gens permet concedir nivells superiors i un augment de la secreció d'enzims de les cèl·lules transduïdes, donant lloc a una major disponibilitat de l'enzim a través de la difusió, del líquid cefaloraquidi i el transport axonal (Gritti, 2011). S'han dut a terme diferents teràpies utilitzant el model de ratolí *twitcher* en els últims anys, com per exemple el transplant de cèl·lules embrionaries neurals i mesenquimals, vectors adenoassociats (AAV) i vectors lentivirals (LV) (Lattanzi et al., 2010; Neri et al., 2011; Rafi et al., 2005; Scruggs et al., 2013).

En el cas de la X-ALD també s'han dut a terme diferents tipus de teràpia. Com s'ha explicat en l'apartat 3.1.6 d'aquest capítol, l'utilització de la combinacions d'antioxidants i el Pioglitazone han mostrat millores en el fenotip de la malaltia en els animals *knock-out* (López-Erauskin et al., 2012; Morató et al., 2013). Per altra banda per aquesta malaltia també s'ha realitzat transplantament de cèl·lules hematopoiètiques i teràpia gènica mitjançant lentivirus (Cartier et al., 2009; Mahmood et al., 2007).

Per a la malaltia de Paliazeus-Merzbacher primerament també es van realitzar estudis en rates deficientes en mielina mitjançant el transplant d'oligodendròcits i de cèl·lules de Schwann a la medul·la espinal que mostraven la generació de noves cèl·lules només en el lloc de l'injecció (Duncan et al., 1988). Posteriorment s'han realitzat diferents estudis basats en la dieta. Un d'aquests per exemple mostra que la curcumina, compost beneficiós per al dany oxidatiu i l'inflamació, augmenta la supervivència dels animals però no recostitueix la mielina ni millora les disfuncions motores (Yu et al., 2012). Un altre estudi en que als animals se'ls dona una dieta rica en colesterol mostra una millora en l'incorporació de PLP a les membranes de la mielina però no es disminueixen els nivellsde la proteïna (Saher et al., 2012). Recentment s'ha descrit un estudi en animals *Plp^{Tg}* que mostra que el tractament amb Lonaprisin, un anatagonista del receptor de progesterona, fa que es disminueixi la sobreexpressió dels nivells de RNA de PLP, s'observa una millora en les funcions motores dels animals i mitjançant microscopia electrònica s'observen menys quantitat d'axons desmielinitzants (Prukop et al., 2014b).

OBJECTIUS

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals (MLC) és una malaltia genètica rara per la qual avui dia encara es desconeix el mecanisme fisiopatològic, i per tant no hi ha cap tractament possible per als pacients. En els darrers anys s'ha identificat un nou gen associat a la malaltia i altres proteïnes que podrien estar-hi implicades. Per tal de poder avançar amb la recerca de la malaltia s'han generat i s'han posat a punt noves eines.

És per això que aquest treball té com a objectiu principal l'estudi de l'implicació de les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC-2 en la leucodistrofia MLC mitjançant l'utilització de models animals i cel·lulars. Aquest objectiu principal s'ha desenvolupat en quatre objectius concrets:

- 1. Caracterització del model *knock-out* de ratolí per a l'estudi de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals.**
- 2. Caracterització i estudi bioquímic del cervell d'un pacient amb MLC**
- 3. Estudi de la relació fisiològica entre GlialCAM i CIC-2 mitjançant l'utilització de cultius primaris d'astròcits i d'oligodendròcits.**
- 4. Estudi de les proteïnes zMLC1 i zGlialCAMa *in vitro* i en el model *knock-out* de peix zebra**

MATERIALS I MÈTODES

En la present Tesi s'ha treballat amb diferents tipus de models animals i cel·lulars i s'ha utilitzat una gran varietat de tècniques. En aquesta part del treball s'explica la metodologia de totes les tècniques realitzades per la doctoranda.

1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1 OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA

Per obtenir una quantitat suficient de DNA per a realitzar diferents experiments necessitem poder-lo amplificar. Per això, partim d'un DNA plasmídic purificat que conté l'insert d'interès i un gen de resistència a un antibiòtic. Aquest DNA purificat té capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes. Aquest procés s'anomena *transformació*. Normalment s'utilitzen soques bacterianes d'*Escherichia coli*. Quan s'han transformat els bacteris, es fan créixer en plaques amb LB-agar que contenen l'antibiòtic al que només presenten resistència els bacteris que han incorporat el DNA plasmídic exogen. En aquesta tesi s'han utilitzat les soques DH5 α i DB3.1.

1.1.1 Obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència

L'electroporació és un mètode en que les soques d'*E.coli* són transformades a unes eficiències de l'orde de 10^9 - 10^{10} transformant/ μ g.

• Materials i reactius

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

• Metodologia

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

1. 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 D.O.₆₀₀ de 0,5-0,7, moment en què 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 centrífuga de 500 ml (previament refredats) i es centrifuguen a 4.000 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 4.000 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 µl que són congelades en nitrogen líquid ràpidament i guardades a -80°C.

1.1.2 Transformació de bacteris

1.1.2.1 Mètode d'electroporació

Aquest mètode de transformació de bacteris es basa en aplicar una descàrrega elèctrica per tal de permeabilitzar la paret bacteriana generant porus, els quals permetran l'entrada de DNA exogen. És necessari que el DNA a transformar estigui lliure de sals per aconseguir una bona eficiència.

• Materials i reactius

- Bacteris *E.coli* de la soca DH5α.
- Medi LB.
- Cubeta d'electroporació de 0,1 cm (BioRad).
- Electroporador (BioRad Micropulser).
- Plaques de Petri preparades amb LB-agar i que continguin l'antibiòtic al que presenti resistència el plàsmid de DNA exogen.

- Metodologia

1. S'afegeixen 0,5-1µl del DNA a transformar en una alíquota de 50 µl dels bacteris electrocompetents atemperades. Cal mantenir-ho sempre en gel.
2. S'homogenitza la mostra i s'introdueix entre els dos electrodes d'una cubeta d'electroporació refredada previament.
3. La cubeta s'introdueix en l'electroporador i se li aplica una descàrrega elèctrica de 375 V mitjançant el programa per bacteris de l'electroporador "Ec1". L'aparell ens dóna una valor en milisegons (*time constant*) que indica el temps en què la mostra ha estat sotmesa al xoc elèctric. Com més gran sigui el valor del temps empleat, major quantitat de porus oberts hi haurà a la paret cel·lular, fet que ajuda a millorar l'entrada de DNA exogen al bacteri. Per tant és un indicatiu de l'eficiència de transformació.
4. Es recupera la mostra afegint 250 µl de LB sense antibiòtic i es passa a un tub.
5. S'incuba la mostra a 37°C durant una 1h en agitació. D'aquesta manera deixem que el gen de resistència a l'antibiòtic, que incorpora el plàsmid, s'expressi.
6. Es sembren 150-200 µl de bacteris en una placa de Petri que conté LB-agar amb l'antibiòtic de selecció.
7. S'asseca la placa uns minuts a temperatura ambient i s'incuba, en posició invertida, a 37°C tota la nit (12-16 hores). Cal fer sempre un control negatiu de transformació, en el que es sembren bacteris sense transformar amb DNA exogen.
8. Al següent dia, es piquen diverses colònies de la placa on s'havien sembrat el bacteris transformats amb el DNA exogen. Es fan pre-cultius amb uns 4 ml de LB juntament amb l'antibiòtic de selecció. En la placa del control negatiu no ha d'haver-hi crescut cap colònia.
9. Els pre-cultius s'incuben a 37°C i en agitació durant tota la nit (12-16 hores) per a poder realitzar l'extracció de DNA.

1.2 OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC

L'objectiu principal d'aquests processos és l'extracció del DNA amplificat obtingut a partir del procés de transformació. Per tal d'aconseguir-ho, s'han utilitzat els equips comercials de *Qiagen (Qiagen Plasmid kit)*. A partir d'aquests processos es poden obtenir petites quantitats de DNA plasmídic en el cas de les minipreparacions o grans quantitats de DNA en el cas de les maxipreparacions. En aquesta Tesi només s'han realitzat minipreparacions.

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

1.2.1 Minipreparacions

L'objectiu és extreure petites quantitats de DNA (0,3-0,6µg/µl) seguint les instruccions de l'equip comercial *Qiagen Plasmid Mini Kit*.

• Materials i reactius

- Pre-cultiu de 4 ml de medi LB (12-16 hores a 37°C i en agitació) que conté l'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 afegixen 250 µl de tampó de lisi i es barreja per inversió fins que la solució es torni de color blau.
4. S'afegixen 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 13.000 r.p.m durant 10 minuts a temperatura ambient.

6. El sobrenedant es transfereix a un tub acoblat a una columna que conté una resina 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 13.000 r.p.m, de forma que el sobrenedant queda dipositat per gravetat en el fons del tub i el DNA queda acoblat a la resina. 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 eppendorf 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 13.000 r.p.m la columna, quedant dipositat el DNA en el fons del nou eppendorf. 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 (1.2.3) i es guarda a - 20°C.

1.2.2 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. Després es centrifuga a 13.300 r.p.m 30 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant amb molta cura per no perdre el pellet i s'efectuen 2-3 rentats amb etanol al 70%. Posteriorment es centrifuguen 5 minuts a 13.300 r.p.m 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.

1.2.3 Quantificació del DNA

Els àcids nucleics tenen un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet la seva quantificació i 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 (NanoDrop), que dóna 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:

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

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

on C 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.

1.2.4 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.
- Oligonucleòtid o *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 el termociclador amb 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 la 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 un assaig experimental concret. Es poden construir o comprar una ampla gamma de vectors d'aplicació diversa: vectors d'expressió proteica de bacteris o mamífers, vectors vírics (lentivirus, adenovirus, retrovirus), vectors per assajos d'interacció proteica (doble híbrid o d'assaig de complementació fluorescent), etc. En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de clonació clàssica mitjançant l'ús d'enzims de restricció, la clonació per recombinació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen) i la clonació de mutants mitjançant la reacció de PCR recombinant.

1.3.1 Reacció de PCR

La reacció en cadena de la polimerasa o 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 per al 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 els *primers* que posseeixen una seqüència complementària a la que es pretén amplificar i extensió de les cadenes d'oligonucleòtids mitjançant una polimerasa termostable.

A cada cicle, idealment, es dobla el nombre de còpies del fragment de DNA, per tant, s'obté una amplificació exponencial a partir d'un nombre inicial baix de còpies. Cada fragment de DNA a amplificar presenta unes característiques diferents, 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 *primers* que puguin formar estructures internes estables a la temperatura a la que s'hagin d'utilitzar (habitualment al voltant de 55°C), o que presentin seqüències complementaries que permetin la formació de dímers, especialment si aquests presenten una estructura tal que deixin extrems 5' protuberants. A continuació es mostra la PCR optimitzada en el laboratori utilitzant la *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen):

Tampó Polimerasa (10X) 5 µl

dNTPs (2 mM cadascun) 5 µl

MgSO₄ (25 mM) 3 µl

Primer F (forward) (10 µM) 1.5 µl

Primer R (reverse) (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

Desnaturalització: 30 segons a 95°C

Hibridació: 30 segons a 45°C

}
} 25 cicles

Elongació: 1minut 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 extensi3n*)

Aquest tipus de PCR ens permet introduir mutacions puntuals al DNA, insercions i delecions relativament llargues (Figura 20).

La tècnica consisteix en generar 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 *primers* 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 complementària 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 es duen a terme 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 PCR recombinant optimitzada en el laboratori amb la *KOD Hot Start DNA polymerase* és la següent:

Tampó Polimerasa (10X) 10 µl
dNTPs (2 mM cadascun) 10 µl
MgSO₄ (25 mM) 6 µl
Primer F (forward) (10 µM) 3 µl
Primer R (reverse) (10 µM) 3 µl
PCR1 5 µl
PCR2 5 µl
DNA Polimerasa (KOD polimerasa 1 U/µl) 2 µl
Aigua Milli-Q 66 µl
Volum final **100 µl**

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

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

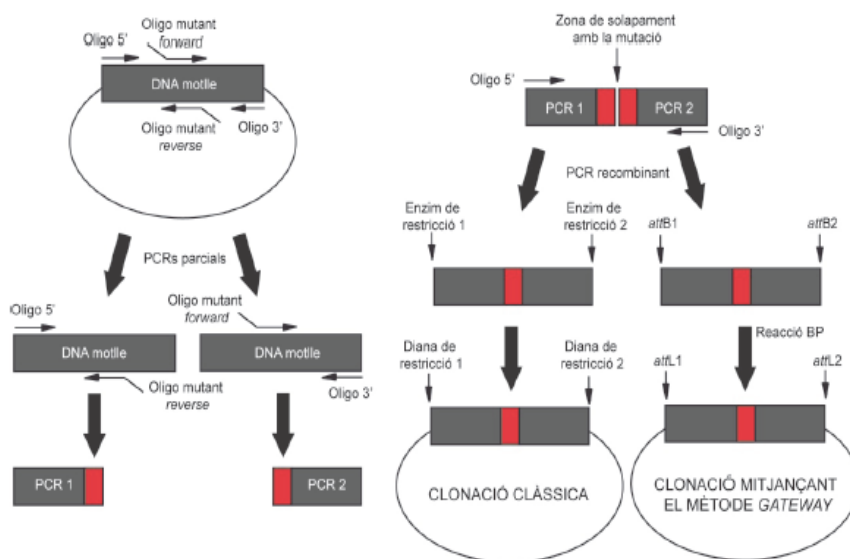


Figura 20. Esquema del mètode de mutagènesi mitjançant PCR recombinant. Es realitzen 2 PCRs parcials (PCR1 i PCR 2) utilitzant els *primers* que contenen la mutació obtenint així 2 fragments amb una zona de solapament (en vermell) que és igual i conté la mutació. A continuació, els 2 fragments s'amplifiquen en una PCR recombinant amb els *primers* dels extrems 5' i 3' obtenint el DNA amb la mutació d'interès, que és clonat per mètode clàssic o per mètode Gateway (també es pot fer per digestió-ligació).

1.3.3 Clonació clàssica

El mètode clàssic de clonació permet introduir 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 es puguin lligar o fusionar.

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 utilitzada (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. Normalment les digestions s'han efectuat a 37°C (a excepció d'alguns enzims que requerien temperatures concretes), durant 2-16 hores, depenent de l'eficiència de la reacció de digestió i de la quantitat de DNA. Es poden efectuar digestions dobles en el cas que la compatibilitat dels dos enzims ho permeti. Si no és 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 gel 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 per a córrer el gel.
- 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. Si es vol 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 i es posa a la cubeta on prèviament s'ha posat una pinta.
3. Quan ja ha polimeritzat el gel, es col·loca en la cubeta d'electroforesis, s'afegeix tampó d'electroforesis (TAE 1X) fins que el gel quedi cobert, 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 digerits 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. Després es talla la banda amb un bisturí, sota la llum ultraviolada, a baixa potència, de manera que es visualitzin els fragments de DNA, i es diposita en un tub eppendorf per a ser purificada.

La purificació del DNA es fa utilitzant el *kit* comercial *High pure PCR product purification kit* (Roche), que es basa en l'acció d'un agent caotròpic que desnatura proteïnes, dissol l'agarosa i promou la unió del DNA de doble cadena (en un rang 100 pb i 48 Kb) a una matriu. 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 (3M guanidina-tiocianat, 10mM Tris-HCl, 5%etanol (v/v), pH 6,6)
- Tampó de rentat (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5). Cal afegir-hi 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 fins que es dissolgui completament l'agarosa (10-15 minuts).
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 13.000 r.p.m 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 13.000 r.p.m durant 1 minut.
5. S'efectua un altre rentat de la columna amb 250 µl del mateix tampó i es torna a centrifugar a 13.000 r.p.m durant 1 minut.
6. S'elimina el sobrenedant i es transfereix la columna a un tub eppendorf 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

La fosfatasa alcalina elimina els grups 5'-fosfat del vector de DNA digerit. D'aquesta manera el vector no es pot religar 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 s'uneixen. 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 que s'utilitza és una relació molar 1:7. La reacció es deixa incubar a 4-16°C durant 16 hores. La lligació es transforma en bacteris electrocompetents i es comprova per digestió i seqüenciació.

1.3.4 Clonació 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 *phage lambda*. 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, anomenat *Entry Clone*, capaç de recombinar amb tota una gamma de vectors destí, ja siguin d'expressió bacteriana, de mamífer, lentivirals, adenovirals, etc., com es representa de forma esquemàtica en la Figura 21.

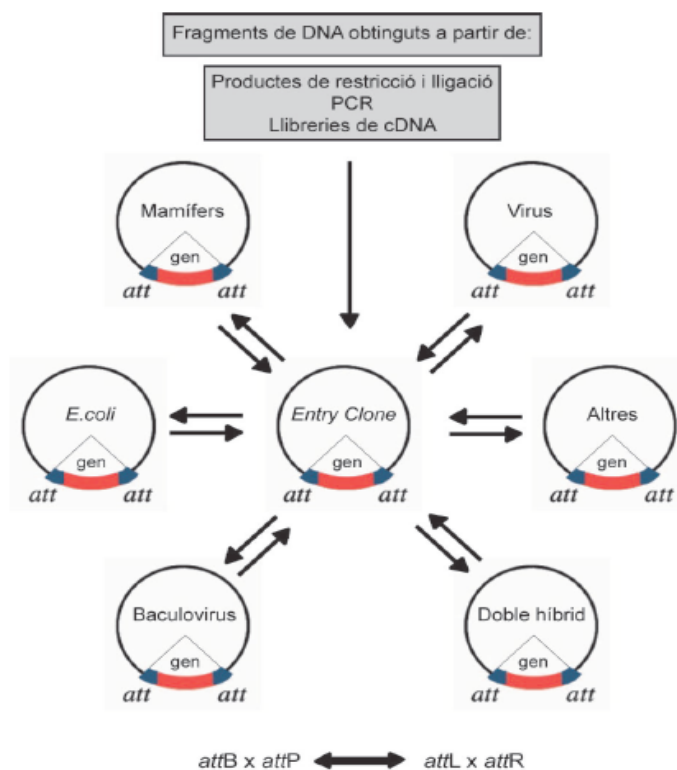


Figura 21. Sistema de recombinació Gateway. Aquest és un sistema de clonació ràpid i senzill amb el que un insert d'interès pot ser clonat per recombinació a qualsevol vector d'expressió a partir d'una construcció intermediària (*entry clone*).

1.3.4.1 Clonatge mitjançant el sistema Gateway simple

El sistema Gateway està basat en el cicle biològic del *fag lambda* (Landy, 1989) i en el seu sistema de recombinació en *E.coli*. En el *fag lambda* la seqüència de recombinació és *attP* (243 pb), mentre que en *E.coli* 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). El resultat d'aquesta reacció són dues noves seqüències de recombinació, *attL* i *attR*, flanquejant el profag recombinat, sense la pèrdua de seqüència de DNA. La reacció pot donar-se de forma inversa durant el procés d'escissió. Quan *attL* i *attR* recombinen (reacció efectuada pel HIF i la proteïna fàgica Escisionasa (Xis)), el λ -DNA s'escindeix del genoma de *E.coli*, regenerant les seqüències *attB* (en *E.coli*) i *attP* (en el *fag*).

Aquesta reacció és específica i bidireccional: $attB \times attP \leftrightarrow attL \times attR$

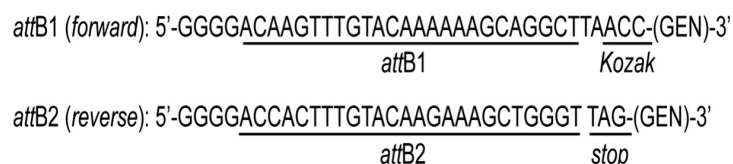
Seguint el protocol del proveïdor (Invitrogen), el primer pas és dissenyar els *primers* que permetin introduir les seqüències *attB1* i *attB2* als extrems del fragment de DNA d'interès mitjançant una reacció de PCR. Una vegada s'aconsegueix flanquejar el fragment amb les seqüències *atts*, s'efectua 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* inhibint el creixement de la majoria de soques de *E.coli* (Bernard and Couturier, 1992).

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

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

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

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



Les quatre guanines (G) afegides a l'extrem 5' de cada oligonucleòtid augmenten l'eficiència de la recombinasa. S'introdueix la seqüència *attB1* i abans d'introduir el gen d'interès, s'afegeix la seqüència *Kozak* (ACC) abans del codó d'inici del gen (ATG) facilitant el reconeixement de la seqüència d'iniciació (AUG) durant el procés de traducció. Seguidament s'afegeixen entre 18 i 25 pb del gen d'interès. A la seqüència *attB2* s'afegeix un codó 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 eppendorf de 1,5 ml, es preparen 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 25°C entre 2-12 hores i s'atura afegint 0,5 µl de solució de proteïnasa K 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, aquest es comprova per digestió i seqüenciació.

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

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

Vector Destí	150 ng
Entry clone	150 ng

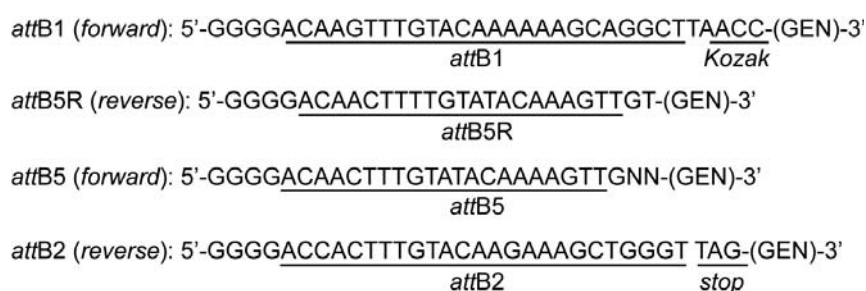
Aigua Milli-Q	fins a 5 µl de volum final
LR clonasa II	1 µl

La reacció s'incuba a 25°C entre 2-16 hores 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 ampicil·lina a 100 µg/ml. Els vectors resultants són comprovats per digestió i seqüenciació.

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

El sistema Gateway permet construir vectors d'expressió de manera ràpida i eficient a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA gràcies al sistema *Multisite*. Aquesta tecnologia utilitza la recombinació específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en l'ordre i orientació correctes. S'utilitza l'equip comercial *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination* (Invitrogen). La diferència entre el sistema *Multisite* i el simple es troba en les seqüències *atts*. Si es vol clonar dos fragments, en un dels fragments de DNA s'introdueix, per PCR, les seqüències *attB1* i *attB5r* i en l'altre fragment les seqüències *attB5* i *attB2*. Aquests dos fragments de DNA es clonen en els seus vectors donadors pDONR221 P1-P5r i pDONR221 P5-P2 respectivament, per generar dos *Entry Clones* els quals es podran recombinar amb el vector destí d'interès (mitjançant l'enzim **LR clonasa II plus**) generant el vector d'expressió desitjat (Figura 22).

Els primers utilitzats en aquest sistema són:



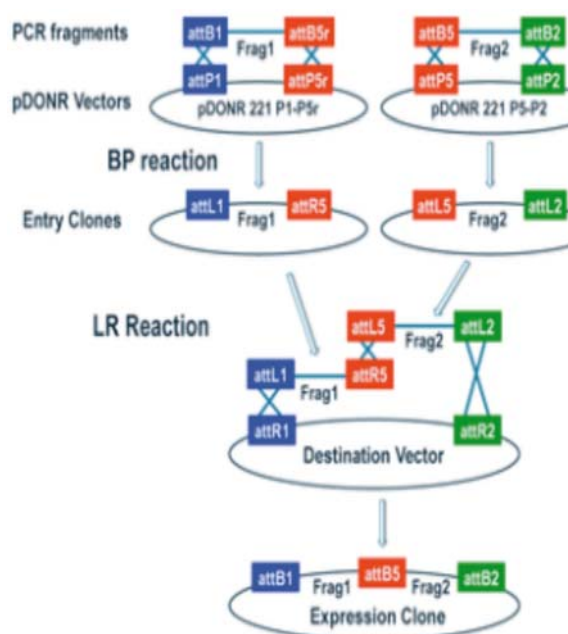


Figura 22. Esquema del sistema de clonació Gateway Multisite. Es pretén clonar el fragment 1 (F1) i el fragment 2 (F2). Mitjançant PCRs es flanquegen els fragments amb els diferents *attBs*, que poden ser recombinats amb els vectors donadors (pDONR) corresponents, per la reacció de la BP clonasa II i 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.

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

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

Vector Destí	20 fmols
Entry clone 1	10 fmols
Entry clone 2	10 fmols
TE o aigua MilliQ	5 μ l (volum final)
LR clonasa plus	1 μ l

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 disseny de mapes, d'oligonucleòtids que contenen les seqüències *att*, integrar virtualment fins a 4 inserts en un vector, guardar en una base de dades tots els mapes elaborats, predir restriccions, etc.

1.4 OBTENCIÓ DE RNA MISSATGER I RT-qPCR

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

Per la correcta manipulació del RNA és necessari recórrer a tractaments especials, ja que es 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 cal seguir algunes mesures quan s'hi treballa:

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. Cal pesar els reactius directament sobre recipients lliures de RNAses. En cas que el reactiu sigui susceptible a ser autoclavat, ha de ser diluït en aigua Milli-Q i posteriorment autoclavat, el qual farà eliminar les RNAses. 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.

En el present treball, l'obtenció de RNA missatger s'ha fet a partir de teixit de ratolí *knock-out* i de cultiu primaris d'astròcits. S'ha utilitzat el *kit Total RNA and protein purification from cultered cells and tissue* (Macherey-Nagel) segons el protocol del fabricant. S'obté entre 2 i 3 µg de RNA que s'utilitza per a fer 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).

1.4.2 PCR transcripció inversa i PCR quantitativa (RT-qPCR)

La tècnica de RT-qPCR és una combinació de dues tècniques que permet amplificar i quantificar simultàniament el RNA missatger. Les tècniques són: (1) la transcripció inversa del RNA de cadena simple per obtenir el DNA complementari (cDNA), mitjançant una transcriptasa inversa, el qual és amplificat per PCR; i (2) la PCR quantitativa o real time-PCR, la qual permet quantificar el cDNA en temps real utilitzant marcadors fluorescents que s'intercalen amb el DNA, o sondes específiques per detectar un cDNA en concret (VanGuilder et al., 2008). El mRNA extret (0,8-1 µg), es transcriu inversament mitjançant el kit Transcriptor First Strand RNA (Roche), seguint les instruccions del fabricant a 50°C durant 30 min amb encebadors hexàmers a l'atzar. La qPCR es realitza utilitzant el kit Lightcycler 480 probes master (Roche) seguint les instruccions del fabricant, amb un volum final de 10 µl, utilitzant la tecnologia UPL (universal probelibrary, Roche). Aquesta tècnica combina els assajos amb SYBR Green I amb l'especificitat dels assajos amb sondes específiques. Com a encebadors es van utilitzar els oligonucleòtids i les sondes indicats a continuació, dissenyats a través de la pàgina <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

Gen	RNA de referència	Oligo F	Oligo F seqüència	Oligo R	Oligo R seqüència	Número de sonda (UPL)	Mida de l'amplicón
MLC1	NM_133241.2	VNO#1072	cctgaatccttcagccataaac	VNO#1073	catgaggagctccaacagc	15	67
MLC1	NM_133241.2	VNO#1124	tcccctccgagatggattat	VNO#1125	ctccctacagcgaagctca	40	79

La PCR es va fer en el termociclador LightCycler 480 en plaques de 384 pous seguint el següent programa:

Desnaturalització: 1 cicle

Amplificació: 55 cicles

Anellament 1 cicle

Refrigeració: 1 cicle

Cada subprograma constava dels següents passos:

Desnaturalització				
Temperatura (°C)	Temps (mm:ss)	Rampa de temperatura (°C/s)	Tipus d'adquisicions	Número d'adquisicions per grau (adquisicions/°C)
95	10:00	4.8		
Amplificació				
Temperatura (°C)	Tempo (mm:ss)	Rampa de temperatura (°C/s)	Tipus d'adquisicions	Número d'adquisicions per grau (adquisicions/°C)
95	00:10	4.8		
60	00:30	2.5		
72	00:01	4.8	Única	
Separació				
Temperatura (°C)	Tempo (mm:ss)	Rampa de temperatura (°C/s)	Tipus d'adquisicions	Número d'adquisicions per grau (adquisicions/°C)
95	00:10	4.8		
50	00:30	2.5		
70		0.6	Contínua	5
Refrigeració				
Temperatura (°C)	Tempo (mm:ss)	Rampa de temperatura (°C/s)	Tipus d'adquisicions	Número d'adquisicions per grau (adquisicions/°C)
40	00:30	2.5		

L'expressió dels gens es normalitza per l'actina (ACTB) utilitzant corbes d'eficiència específiques per cadascun d'ells, tant en les reaccions simples com en les múltiples. Les dades obtingudes de la qPCR es tracten amb el software Light Cycler 488 SW 1.5 de Roche posteriorment es corregeixen els valors RIN utilitzant algoritmes.

2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES

2.1 OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL

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

Per tal de poder realitzar un correcte anàlisis, de les proteïnes d'interés, en alguns dels experiments d'aquesta tesi s'han hagut d'obtenir proteïna i posteriorment quantificar-la degudament.

- Materials i reactius

- PBS 1X

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

- Metodologia

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

La **solubilització d'extractes cel·lulars** es fa en fred per evitar la desnaturalització de les proteïnes. 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'hi afegeixi a sobre el tampó de lisi (a 4°C, en gel). El volum de tampó de lisi utilitzat varia en funció del número de cèl·lules que hi ha, el qual depèn de la superfície o del diàmetre de la placa de cultiu on han sigut cultivades. Així, les cèl·lules procedents d'una placa de 100 mm de diàmetre són 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 100-120 μ l de tampó. Es raspa les cèl·lules mitjançant un raspador. Es resuspenen bé amb l'ajut d'una pipeta i es transfereixen a un tub eppendorf.

2. S'incuba la mostra durant 1 hora a 4°C en agitació orbital.

3. Es centrifuga el lisat a 13.000 r.p.m durant 10 minuts a 4°C i es recull el sobrenedant, el qual correspon a la fracció de proteïna soluble.

4. 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 PBS 1X. El volum de PBS 1X depent del tipus de placa utilitzada.
2. Amb un raspador estèril, es desenganxen les cèl·lules immerses en el PBS 1X i es passen a un tub falcon 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 cel·lular. 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 de la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment.

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 Obtenció d'extracte de membrana total a partir de teixits

Aquest treball esta centrat principalment en 3 proteïnes de memembrana: MLC1, GlialCAM i CIC-2. S'utilitzen les mostres de teixit nerviós, principalment cervell i cerebel de ratolí i diferents regions de cervell humà, per extreure les membranes totals i així enriquir la fracció d'aquestes proteïnes de membrana.

- Materials i reactius

- Tampó d'homogeneïtzació: PBS 1X, Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, Sacarosa 250 mM, pH 7.4.
- Inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1mM, Leupeptina i Pepstatina a 2 µM).
- Politró.
- Teixit 0.5-1 g.

- Tubs d'ultracentrífuga, rotor i ultracentrífuga.

- Materials i reactius

1. Es prepara el tampó d'homogeneïtzació i s'hi afegeixen els inhibidors de proteases (tot a 4°C)
2. S'introdueix un fragment de teixit en un tub d'assaig de 15 ml, i a continuació s'hi afegeix tampó de homogeneïtzació fred (el volum dependrà de com sigui de gran el teixit, per 1g de teixit es posa 8 ml de tampó).
3. Es procedeix a homogeneïtzar el teixit amb el politró. Es fan 3 intervals de 10-15 segons a màxima potència i cal mantenir-ho sempre en gel.
4. Es centrifuga l'homogenat a 4.000 g durant 10min a 4 °C.
5. A continuació, es recull el sobrenedant i es diposita en un tub eppendorf de 2 ml. Es centrifuga a 100.000 g durant 120 min a 4 °C (s'utilitzà el rotor 70Ti de Beckman Coulter).
6. Es descarta tot el sobrenedant amb cura, i es resuspèn el *pellet* amb 100-500 µl d tampó d'homogeneïtzació amb inhibidors, primer amb pipeta i després amb una xeringa d'insulina fins que l'homogeneïtzació de la mostra sigui total. Cal fer-ho poc a poc i amb molt de compte ja que el *pellet* queda molt enganxat a les parets del tub.
7. Finalment, es valora la concentració proteica pel mètode Bradford, es fan alíquotes i es congela a -80 °C .

2.1.3 Determinació de la concentració proteica

Després de l'extracció o la purificació de proteïnes és necessari conèixer la seva concentració, no només per 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 utilitzats en aquest treball han estat 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 96 pous
- Lector ELISA (Biotek)
- Reactiu Bradford. Solució comercial *BioRad Protein Assay* (Coomassie blau brillant G-250, àcid fosfòric i metanol), diluïda 1/5 en aigua destil·lada filtrada.
- Solució de BSA (albúmina bovina) a 2mg/ml en aigua Milli-Q.

- Metodologia

1. 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.
2. 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.
3. 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 l'àcid bicinconínic (BCA) (*Protein Assay Reagent*, 23225), el qual s'ha realitzat seguint les especificacions del fabricant (Pierce). Aquest mètode es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir el 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'albumina 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 i es porta a volum final de 10 μl amb aigua Milli-Q. 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 15-20 min a 37°C. Finalment, es procedeix a la lectura mitjançant el lector d'ELISA a 595 nm.

2.2 ASSAIG DE WESTERN-BLOT (WB)

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

El procés es realitza seguint diferents etapes:

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

1) Electroforesi SDS-PAGE

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

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

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

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

- Materials i reactius

- Extractes de proteïna total o de membrana a partir de cèl·lules o teixit en un tampó de càrrega.

- Sistema de Western-Blot *Mini-Protean* (BioRad).

- Font de corrent elèctrica.

- Tampó d'electroforesi 10X (Tris base 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1%). S'utilitza 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'utilitza a 1X.

- Solució gel separador (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS).

- Solució gel concentrador (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS).

- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37,5:1) (BioRad).

- APS (Persulfat d'amoni 10% en aigua).

- TEMED.

- Estàndards de pes molecular pretenyits (BioRad o Fermentas).

- Metodologia

1. Preparació de les mostres. En un tub eppendorf 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 una concentració final de 1X. Les mostres s'escalfen en un termoagitador i la temperatura dependrà del tipus de proteïna a detectar. 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 neteja 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%
Acilamida 40%	3,8 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml	Acilamida 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, vigilant que no es formin bombolles. El gel separador ha d'ocupar les tres quartes parts inferiors del sistema. Abans de la polimerització, s'afegeix una capa d'isopropanol a la part superior del gel perquè el límit superior sigui recte. 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. 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.

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'utilitza 1X + 20% metanol (v/v). El mateix tampó s'utilitza pel muntatge dels cassets.
- Aigua destil·lada.
- Metanol.

- Metodologia

1. Primer, cal hidratar la membrana de manera que sigui receptiva a immobilitzar proteïnes. Es submergeix la membrana en una cubeta amb metanol absolut durant 5 minuts. A continuació, es canvia l'etanol per aigua destil·lada i ho deixem durant 5 minuts més i finalment es deixa equilibrar amb tampó de transferència.

2. Mentres s'està hidratant la membrana es preparen 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, a sobre de 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 de manera que el costat fosc coincideixi amb el pol negatiu dels elèctrodes ja que les proteïnes es transferiran en aquella direcció. Finalment s'omple la cubeta amb tampó de transferència. 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.

3) Immunodetecció

Quan ha passat el temps de 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 TTBS1X).
- Anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig (depèn de cada anticòs).
- Anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP) (dilució 1:10000).
- 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. La membrana es preincuba durant 60 minuts i en agitació amb una solució rica en proteïnes (llet, en aquest cas), que s'uniràn als llocs d'interacció inespecífica.

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 ml). 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 d'eliminar les unions inespecífiques, 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 específics per als dominis Fc de les immunoglobulines G, 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 i tapat de la llum. 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 en un aparell de revelat fotogràfic (Fujifilm).

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

2.3 OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS

Al llarg d'aquesta tesi s'han anat generant diferents eines necessàries per a la recerca de la leucodistròfia MLC. Una de les més importants és la generació d'anticossos contra les proteïnes d'interès.

La taula 5 mostra alguns dels anticossos generats i posteriorment purificats en el laboratori al llarg d'aquesta tesi. Alguns s'han generat i utilitzat per a la realització d'aquesta tesi i altres s'han utilitzat en altres projectes del grup. En aquest apartat s'explica la purificació d'un dels anticossos que s'han utilitzat en aquesta tesi com a exemple de la metodologia.

Anticòs	Seqüència del pèptid	Aminoàcids
GliaIcAM C-terminal C1	EADTLPRSGEQERKNPM	241-258
GliaIcAM C-terminal C2	QRIREQDESGQVEISA	353-366
CLC-2 C-terminal	HGLPREGTPSDSADKSQ	892-907
zGliaIcAMa C-terminal	EDPPTDGENTMHHHSLPR	405-422
zCICK N-terminal	ENENDEQRVQEDKREEC	12-27
zBarttin C-terminal	RPDPNREMYGRVKDS	150-165
zCIC-1a C-terminal	QAVPENREEEEESEEPV	996-1011
zCIC1b C-terminal	PGGEGDDEKERDEEPL	925-940

Taula 5. Resum dels anticossos purificats en el laboratori durant la realització d'aquesta tesi. Es mostra el nom que se li ha donat a cada anticòs juntament amb la seqüència del pèptid i els aminoàcids que comprén la seqüència.

A través dels serveis de l'empresa *EUROGENTEC*, es van immunitzar dos conills per a l'obtenció d'un anticòs contra la proteïna zGliaIcAMa de peix zebra. Primer és va dissenyar un pèptid sintètic corresponent a la regió C-terminal de la proteïna, i per predicció informàtica es va seleccionar una regió amb un nivell alt d'antigenicitat i que no mostrava homologia amb altres proteïnes. El pèptid que es va seleccionar es el següent: (C)EDPPTDGENTMHHHSLPR i correspon als aminoàcids 405-422 de la proteïna. Es van realitzar 3 injeccions a cada animal i posteriorment es van obtenir els sangrats de cada un dels conills. Aquests es van testar per WB en extractes cel·lulars on s'hi havia transfectat el plàmid zGliaIcAMa-Flag. Com a control negatiu es van utilitzar els sèrum pre-immunes. Finalment, es va escollir el sèrum on es detectava millor la proteïna i es van purificar les immunoglobulines G (IgG) per afinitat utilitzant el corresponent pèptid.

2.3.1 Purificació de IgGs mitjançant afinitat per al pèptid

Les IgGs amb major senyal es van seleccionar i es van purificar per afinitat amb el pèptid. El pèptid amb el que va ser immunitzat l'animal del qual es va obtenir el sèrum tenia una cisteïna reduïda. El seu grup sulfidril era capaç d'acoplar-se covalentment a una resina *SulfoLink* (Pierce), la qual permetia la purificació de l'anticòs a través d'aquesta columna d'afinitat. Mitjançant una activació iode-acetil, el pèptid té la capacitat d'unir-se covalentment i de manera estable a la resina. Després de bloquejar els llocs d'unió inespecífics, es va incubar la columna amb el sèrum. D'aquesta manera, només els anticossos capaços de reconèixer el pèptid específicament s'unirien a la resina de la columna amb el pèptid acoblat. Finalment, aquests anticossos purificats s'elueixen de la columna amb una solució de pH àcid (2,5).

- Materials i reactius

- Columna de cromatografia *Bio-Rad* de polipropilè de 10 ml de capacitat.
- Resina d'acoplament *Sulfolink* (Pierce).
- Tampó d'acoplament 5X (Tris-HCl 250mM, EDTA 25mM, pH 8,5).
- Solució de bloqueig (Cisteïna 50mM en tampó d'acoplament 1x).
- Solució de rentat (NaCl 1M).
- Solució de manteniment (PBS, NaN₃ 1mM).
- TBS 1X
- PBS 1X
- Tris 1m pH 9
- Tampó de neutralització (Tris 1M, NaCl 2M, pH 8,5).
- Tampó d'elució (Glicinia 100mM, pH 2,5).
- Sèrum amb IgGs

- Metodologia

A) Acoblament del pèptid a la columna.

1. Es prepara 1mg de pèptid (proporcionat per la casa comercial) en 200 µl d'aigua Milli-Q i 50 µl de tampó d'acoblament 5X. Cal barrejar-los fins aconseguir una completa homogenització. Es guarda una mostra de 10 µl i es rotula com a "pèptid abans de l'acoblament".
2. S'afegeix 2 ml de resina *Sulfolink* en la columna *Bio-Rad* i s'equilibra amb 12 ml de tampó d'acoblament 1X (és important que la columna no es quedi seca).
3. Després d'equilibrar la columna, s'aplica la barreja del pèptid (250 µl) i 2 ml de tampó d'acoblament 1X. Es tapa la columna i s'homogenitza bé la barreja. S'incuba durant 2 hores en un orbital a temperatura ambient.
4. Es deixa caure la barreja per gravetat i es recull una altra petita mostra que es rotula com "pèptid després de l'acoblament". Es mesura la concentració de les dos mostres a 280 nm. La comparació ens donarà una idea de la quantitat de pèptid que ha quedat unit a la columna. Si s'observa que el percentatge d'acoblament és baix es deixa més temps la incubació.
5. S'aplica a la columna 2 ml de solució de bloqueig i s'incuba durant 15 minuts en agitació en l'orbital a temperatura ambient i després 30 minuts més però sense agitació aquest cop.
6. Es deixa caure la solució de bloqueig i seguidament es fan dos rentats de la columna amb NaCl 1M. A partir d'aquest pas, el pèptid es troba acoblat a la columna cromatogràfica. Aquesta columna es podrà reutilitzar en el futur per a purificar més anticòs.
7. Cal guardar la columna amb NaN_3 NaCl 1M , ben tapada i a 4°C.

B) Purificació del sèrum per afinitat

1. Es prepara una dilució del sèrum en TBS 1X a una relació 1:1 (4 ml de sèrum en 4 ml de TBS 1X). Si es vol augmentar l'eficiència de purificació es pot canviar la relació. El pH ha d'estar ajustat a pH 8,5 amb Tris 1M pH 9.
2. La columna activada amb el pèptid es neteja dues vegades amb TBS 1X i s'incuba amb la barreja de sèrum i TBS 1X durant 3-4 hores en un orbital a temperatura ambient.
3. Passat el temps d'incubació, s'elueix la barreja per gravetat i es neteja la columna dues vegades amb PBS 1X i un tercer cop amb PBS 0,1X.

4. Per a l'elució de la columna de s'addiciona glicina 100 mM pH 2,5. Es recull l'eluit en 16 fraccions de 200 µl en eppendorfs on prèviament s'hi ha afegit 20 µl de solució Tris 1M, NaCl 2M, pH 8,5 (10X), amb la finalitat de neutralitzar el pH àcid de la mostra. Per tant, s'afegeixen 200 µl de glicina i es recullen les fraccions de manera continuada.

5. Quan es tinguin recollides totes la fraccions, la columna es neteja amb solució de rentat i finalment amb la solució de NaN₃ NaCl 1M. Es guarda amb uns 4 ml d'aquesta mateixa solució a 4°C.

Les fraccions van ser diluïdes 1/50 en llet al 5% en PBS 1X provades per WB en Es va utilitzar com a control positiu l'anticòs Flag a dilució 1/500. Finalment es van barrejar les fraccions amb major intensitat de senyal.

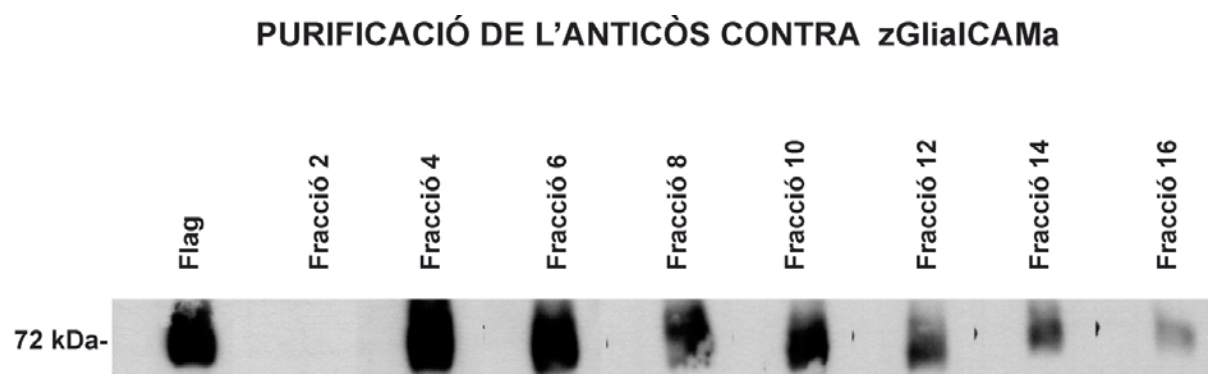


Figura 23. Purificació de l'anticòs contra la regió C-terminal de la proteïna zGlialCAMa de peix zebra. Anticòs purificat a partir del mètode d'afinitat per al pèptid. Anàlisi per WB dalgunes fraccions purificades prèviament. S'utilitza com a control cèl·lules HEK293 no transfectades o transfectades amb el plàsmid zGlialCAMa-Flag (50µg de proteïna). A partir de la fracció 4 es detecta la banda corresponent a la proteïna (72 kDa aproximadament) amb major intensitat.

2.4 IMMUNOCITOQUÍMICA

Durant aquesta Tesi s'han realitzat estudis immunocitoquímics en cèl·lules HeLa i en cultius primaris d'astròcits i d'oligodendròcits. S'ha estudiat la localització de les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC-2 ens els diferents tipus de cultius, així com proteïnes marcadores d'unions en astròcits en el model de ratolí *knockout* per MLC1.

- Materials i reactius

- Cultiu cel·lular en cobreobjectes.
- Placa de cultiu de 24 pous.

- Pinces de cirurgia de precisió.
- Portaobjectes.
- PBS 1X estèril.
- Paraformaldehid (PFA) 3% en PBS 1X.
- Solucions d'autofluorescència (NH_4Cl 50 mM en PBS 1X; i Glicina 20 mM en PBS1X).
- 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 (majoritàriament a dilució 1/100 o 1/50) i secundaris (dilució 1/500).
- Medi de muntatge *Vectashield* (Vector).
- DAPI (150 ng/ml)

- Metodologia

1. Es retira el medi de les plaques de cultiu i es fan tres rentats amb PBS 1X.
2. Es fixen les cèl·lules amb PFA 3% en PBS durant 15-20 minuts a temperatura ambient.
3. Es fan tres rentats ràpids amb PBS 1X per tal d'eliminar l'excés de PFA. Si no es realitza la immunocitoquímica al moment, es poden guardar els cobreobjectes fixats a 4°C en PBS 1X + 0,05% NaN_3 , per tal d'evitar possibles contaminacions.
4. Es dipositen els cobreobjectes en una placa de 24 pous amb la cara que conté les cèl·lules cap amunt i s'hi afegeix PBS 1X. És important no deixar els cobreobjectes secs.
5. Per tal d'eliminar l'autofluorescència de les cèl·lules, s'incuben en una solució NH_4Cl 50 mM durant 10 minuts, i seguidament en una solució de glicina 20 mM durant 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 realitzar 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.

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 realitza 1 rentat amb solució de permeabilització i després 3 rentats amb PBS1X 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 assecat 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.

13. Les mostres són observades amb el microscopi invertit de fluorescència *Olympus DSU amb spinning disk*.

2.5 ELISA

En aquesta Tesi s'han realitzat experiments utilitzant aquesta tècnica per a la purificació d'anticossos policlonals. De la mateixa manera que per WB, es van provar les diferents fraccions purificades per ELISA i l'especificitat dels anticossos es va poder comparar pels dos mètodes.

- Materials i reactius

- Placa de 96 pous EIA/RIA (*Costar*)
- Lector d'ELISA (*BioTec*)
- Pèptid/proteïna/anticòs de captura
- PBS 1X estèril
- Solució de bloqueig (PBS 1X, 2% BSA)
- Solució de rentat (PBS 1X, 1% Tween20)
- Anticossos primaris i secundaris
- Reactiu de revelat OPD (Sigma). Es prepara amb 20 ml d'aigua Milli-Q estèril i s'hi dissol una pastilla gran i una de petita de les que venen en el *kit* comercial. Cal protegir-ho de la llum.

- Metodologia

1. Es prepara la placa de 96 pous amb el pèptid de captura, on s'hi afegix 100 µl per pou a una concentració de 3 µg/ml en PBS 1X estèril. La placa s'incuba durant tota la nit a 4°C en una atmòsfera humida per tal que el pèptid no pugui assecat-se.
2. Es descarta la solució que contenia el pèptid i es fan 2 rentats amb 200 µl/pou amb PBS 1X.
3. Es bloqueja la placa amb 200 µl/pou de PBS 1X + 2% BSA. La placa s'incuba a 37°C durant 1 hora.
4. Durant aquest temps es poden anar preparant les dilucions de l'anticòs que es vagin a utilitzar, tinguent en compte que el volum final per pou ha de ser de 100 µl. L'anticòs es dilueix amb solució de bloqueig.

5. Posteriorment es descarta la solució de bloqueig i es neteja la placa amb PBS-Tween (200 µl/pou)
6. S'afegeixen 100 µl d'anticòs primari i es deixa en incubació durant 1 hora i tapat de la llum a temperatura ambient. És important afegir un control negatiu (100 µl de solució de bloqueig sol) i un control positiu (un anticòs prèviament purificat i que funcioni).
7. Es realitzen 4 rentats amb PBS-Tween.(200 µl/pou)
8. S'afegeixen 100 µl/pou de l'anticòs secundari, diluït 1/3000 en solució de bloqueig. S'incuba 30 minuts a temperatura ambient i tapat de la llum.
9. Es descarta l'anticòs secundari i es fan 3 rentats amb PBS-Tween seguit de 2 rentats més amb PBS 1X (200 µl/pou).
10. S'afegeix 100 µl/pou de la solució de revelat (OPD). S'incuba entre 15-20 minuts a temperatura ambient i tapat de la llum.
11. Es llegeix la placa en el lector d'ELISA a 450 nm.

2.6 MESURA DE L'EXPRESSIÓ EN SUPERFÍCIE PER LUMINESCÈNCIA

Aquesta tècnica es basa en la detecció immunològica de proteïnes endògenes o transfectades en la superfície de la membrana cel·lular . En la present Tesi aquesta metodologia s'ha utilitzat per estudiar l'expressió en superfície de la proteïna MLC1 i una mutació concreta d'aquesta (S69L) amb o sense la presència de GlialCAM. Tan la proteïna MLC1 com el mutante S69L portaven un epítop HA en un dels seus llaços extracel·lulars. Aquest epítop és detectat mitjançant una reacció immunocitoquímica per un anticòs (3F10 rat anti-HA), al qual se li unia específicament un anticòs secundari unit a peroxidasa de rave (HRP). Quan se li afegia el reactiu *Power Signal Elisa* es produïa una reacció quimioluminescent amb la HRP del complex, que era quantificada al luminòmetre donant un valor relatiu corresponent a la quantitat de proteïna detectada a la membrana plasmàtica.

- Materials i reactius

- Luminòmetre TD. 20/20 (*Turner BioSystems*).
- Plaques de cultiu de 10 cm de diàmetre.
- Plaques de cultiu de 35 mm de diàmetre.
- Cèl·lules HeLa transfectades.

- Paraformaldehíd al 3% en PBS 1X.
- PBS 1X.
- Solució de bloqueig (PBS 1X + 1% BSA).
- Anticòs primari (3F10 Rat anti-HA, Roche).
- Anticòs secundari (goat anti-rat HRP 1/3500, Jackson ImmunoResearch).
- Solució *Power Signal Elisa* (Pierce).
- Solució de lisi (NaOH 200 μ M + 1% SDS).

- Metodologia

Per a dur a terme aquesta metodologia cal tenir en compte algunes observacions:

- a) Les cèl·lules es transfecten en placa de 10 cm i a les 24 hores són transferides a les plaques de Petri de 35 mm, ja que són les que encaixen en el luminòmetre.
- b) Es fan 4 rèpliques per a cada punt o mostra.
- c) L'aplicació dels reactius s'efectua per placa, sempre en el mateix ordre de manera que els temps de les reaccions siguin per a totes les rèpliques iguals.
- d) El volum dels reactius, que s'afegiran durant tots els passos, serà de 1 ml.
- e) Cal fer tots els rentats indicats en el protocol per tal d'evitar al màxim soroll de fons.
- f) Tot el protocol es realitza a temperatura ambient.

Així doncs, el protocol a seguir és el següent:

1. Es renten les cèl·lules amb PBS 1X i es fixen amb PFA 3% durant 15-20 minuts. Després es fan 3 rentats ràpids amb PBS 1X.
2. Seguidament, s'incuben en solució de bloqueig durant 30 minuts (no es fa permeabilització ja que volem detectar la presència de proteïna a la membrana plasmàtica).
3. S'incuben les cèl·lules 1 hora amb l'anticòs primari 3F10 *rat* anti-HA diluït 1/500 en solució de bloqueig.
4. Seguidament es fan 3 rentats ràpids amb solució de bloqueig seguits de 3 rentats més de 15 minuts cada un, també en solució de bloqueig.

5. Després dels rentats, s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs secundari anti-rat HRP, diluït 1/1000 en solució de bloqueig, durant 20 minuts. És important no passar-se d'aquest temps d'incubació.
6. Passat aquests 20 minuts, es fan 3 rentats seguits en solució de bloqueig i 1 últim rentat de 15 minuts. Després es fan 4 rentats seguits amb PBS 1X i finalment 4 rentats més amb PBS 1X però de 15 minuts (els últims rentats en PBS 1X poden passar dels 15 minuts).
7. Per a realitzar el revelat cal mesclar la solució A i la solució B del reactiu *Power Signal Elisa* en una proporció 1/1 v/v, essent el volum final per aplicar a cada placa de 500 µl. El reactiu s'afegeix sobre la placa i ràpidament es col·loca en el luminòmetre prèviament calibrat. La calibració es porta a terme ajustant la sensibilitat amb la mostra que creiem que serà la més positiva, ja que el luminòmetre té una sensibilitat màxima, i per tant és necessari ajustar la sensibilitat del nostre experiment per tal de no superar el rang en el que l'aparell pot mesurar.
8. Per normalitzar els valors relatius obtinguts, es va realitzar una correcció per la proteïna total. Per tant, un cop llegides totes les plaques, es renten amb PBS 1X i s'afegeix solució de lisi (300 µl). Les mostres són resuspeses i la concentració de proteïna es mesura pel mètode de BCA.

3. CULTIUS CEL·LULARS

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

3.1 LÍNIES CEL·LULARS

En aquest treball s'han utilitzat dos tipus de línies cel·lulars: cèl·lules HeLa i cèl·lules HEK 293. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i per tenir incorporades seqüències del 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

3.1.1 Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK 293

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 30 minuts. Regularment es realitzen proves per comprovar l'absència de contaminació per micoplasma. El medi es canvia cada tres dies i es fa un seguiment del creixement del cultiu de manera que quan està proper a la màxima confluència es tripsinitza i es torna a sembrar el cultiu més diluït.

3.1.2 Tripsinització

Quan el cultiu cel·lular arriba aproximadament al 100% de confluència, cal tripsinitzar-lo per evitar que les cèl·lules morin. Primerament s'elimina el medi i s'efectuen 2-3 rentats amb PBS 1X estèril, en cas contrari, els factors presents en l'FBS del medi inhibeixen l'acció de la

tripsina. A continuació s'afegeix al cultiu tripsina-EDTA 1X (Biological Industries). Es deixa incubar de 5 a 15 min a l'incubador de 37°C. Quan s'observa al microscopi que les cèl·lules s'han desenganxat i disgregat, s'hi afegeix medi de cultiu per parar la reacció i es resuspenen. A continuació, les cèl·lules es poden comptar i sembrar o fer un cultiu de manteniment.

3.1.3 Congelació de cèl·lules

Les cèl·lules eucariotes 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 r.p.m. 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. 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'efectua de manera ràpida, al contrari de la congelació, amb l'objectiu d'eliminar ràpidament el DMSO, tòxic per a les cèl·lules. El criotub es posa en un bany a 37°C. Una vegada descongelat es resuspèn en un volum 10 vegades superior del medi pre-atemperat. Seguidament, es centrifuga a 5 min a 1000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 10 ml de medi, es plaqueja i es deixa créixer a l'incubador.

3.2 TRANSFECCIÓ CEL·LULAR

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

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

- Materials i reactius
 - Medi DMEM complet (10% FBS inactivat; 1% penicilina/estreptomicina; 1% glutamina).
 - Medi Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
 - Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (a un 70-80% de confluència).

- PBS 1X estèril
- Agent lipídic: transfectina (BioRad)
- Aigua Milli-Q estèril.
- Preparació de DNA plasmídic d'interès.

- Metodologia

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

1. Es sembren les cèl·lules un dia abans. la confluència ha de ser 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.
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. Durant la 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 CULTIUS PRIMARIS

L'únic sistema cel·lular on MLC1 s'expressa de manera endògena és el cultiu primari d'astròcits. És per això que s'han realitzat cultius primaris d'astròcits de rata i del model de ratolí *knock-out* per *Mlc1*. El cultiu primari d'oligodendròcits ens ha permès, per primer cop, estudiar les proteïnes GlialCAM i CIC-2, de manera endògena, fora del model utilitzat fins al moment. Per a l'obtenció d'astròcits primaris purs, s'han utilitzat rates i ratolins d'estadi post natal entre P0 i P2, i s'ha seguit el protocol de (McCarthy and de Vellis, 1980). En el cas dels oligodendròcits també s'han utilitzat rates a estadi post-natal entre P0 i P3 i s'ha seguit el protocol descrit en (Chen et al., 2007; Favre-Kontula et al., 2008). Aquests protocols estan aprovats pel comitè ètic de la Universitat de Barcelona i l'Estabulari del Campus de Bellvitge.

3.3.1 Obtenció de cultius primaris d'astròcits de rata i de ratolí

- Materials i reactius
 - Rates de la soca Sprague-Dawley (Charles River), en estadi P0-P3 i ratolins de la soca C57bl6 , en estadi P0-03.
 - Material de cirurgia (tisores, 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 .
 - Tubs *falcon* 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.
 - Medi DMEM (Biological Industries) complet
 - Tripsina-EDTA 1X (Biological Industries) complet

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

- Metodologia

A) Dissecció

1. Les cries són anestesiades en gel i posteriorment decapitades amb unes tisores. Es disposen 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 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. Tant els còrtex com els hipocamps es disposen en medi de dissecció nou fresc en una placa de Petri (en gel).

B) Cultiu

1. Dins la campana de cultius primaris es transfereixen els hipocamps i 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.

2. 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.

3. Es centrifuguen les mostres 5 minuts a 1000 rpm a temperatura ambient. Es retira el sobrenedant i el *pellet* 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.

4. 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.

5. Es canvia el medi el dia següent, i cada 2-3 dies.

C) Purificació del cultiu d'astròcits

1. 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.

2. 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.

3. Es procedeix a una agitació durant tota la nit a 250 rpm a 37°C.

4. 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.

5. Finalment es fa un comtatge de cèl·lules i es sembren les plaques de cultiu a una densitat de 50.000-80.000 cèl·lules en plaques de 24 pous, 200.000 en plaques de 6 pous i 10⁶ en plaques de 100 mm de diàmetre.

6. El medi es canvia cada 3-4 dies.

7. Quan el cultiu pur arriba a una confluència del 80% 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 G0/G1 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 .

3.2.2 Obtenció de cultius primaris d'oligodendròcits de rata

- Materials i reactius

- Rates de la soca Sprague-Dawley (Charles River).
- Material de cirurgia (tissors, pinces de microcirurgia i micropinces tallants).
- Plaques de Petri de 10 cm i de 35 mm de diàmetre.
- Plaques Sterillin.
- Pipetes Pasteur de plàstic estèrils.
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils.
- Cobreobjectes estèrils .
- Tubs *falcon* estèrils de 15 ml i de 50 ml.
- Filtre estèril de 40 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.
- Medi DMEM (Biological Industries) complet.
- Medi DMEM20S (20% FBS inactivat, 1% glutamina, 1% penicilina/estreptomina, 1% piruvat de sodi).
- Medi BDM (DMEM, 1% glutamina, 1% piruvat de sodi, 0,1 %BSA, 50 µg/ml apotransferrina, 50 µg/ml insulina, 30 nM Na-selenita, 10nM D-biotina, 10 nM hidrocortisona).
- Medi OPC (BDM + 10ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF).
- Medi de diferenciació (BDM + 30 nM triiodotironina, 20ng/ml CNTF, 10µM forskolina).
- Tripsina-EDTA 1X (Biological Industries) complet.
- DNAsa I (1000 U/ml en 0,15 M NaCl).
- Poly-D,L-ornitina (Sigma)

- Metodologia

A) Dissecció

És el mateix procediment que en cas de realitzar un cultiu primari d'astròcits (apartat 3.2.1).

B) Cultiu

És el mateix procediment que en cas de realitzar un cultiu primari d'astròcits però en aquest cas el medi utilitzat és el DMEM20S (apartat 3.2.1).

C) Aïllament d'OPCs

1. Quan els flascons arriben a la màxima confluència cal aixecar el cultiu per tal d'aïllar els oligodendròcits de la resta de cèl·lules glials.

2. Es fa una pre-agitació de les cèl·lules a 37°C durant 1 hora a 200 rpm. Cal que els taps del flascons estiguin ben tancat amb parafilm per evitar contaminacions.

3. Es decarta el medi dels flascons i es posa de nou 10 ml de DMEM20S. Els flascons es deixen a l'incubador a 37°C durant unes hores.

4. Es procedeix a fer una agitació durant tota la nit (12-16 hores) a 250 rpm a 37°C.

5. Passades les hores, es recullen les cèl·lules en suspensió dels flascons i es dipositen a una placa no tractada però estèril (Sterillin). Podem tornar a afegir 10 ml de DMEM20S als flascons i repetir l'agitació o també es poden utilitzar per a obtenir astròcits.

6. Incubar les plaques durant 30-60 minuts a l'incubador de primaris a 37°C per tal de que els astròcits i la microglia que ens haguem pogut emportar es quedin enganxats a la placa

7. De manera suau, es mouen a les plaques en cercle i es recol·lecten les cèl·lules en suspensió en un tub de 50 ml.

8. Aquestes cèl·lules es passen de nou per un filtre estèril, aquest cop de 20-40 µm, i es dipositen en un nou tub de 50 ml.

9. Es centrifuguen les cèl·lules 10 minuts a 800 rpm.

10. Cuidadosament s'elimina el sobrenedant sense desenganxar el pellet. Cal anar amb molt de compte perquè aquest pellet és molt petit.

11. Es resuspèn el pellet en 500µl de medi OPC.

12. Es compten les cèl·lules i es planten en diferents plaques per a relitzar els experiments. Les plaques han d'estar pre-tractades amb poly-D,L-ornitina (solució de treball 50µg/ml). Es sembren unes 10000-15000 cèl·lules per pou. Cal afegir medi OPC a les plaques on s'han plantat els oligodendròcits.

13. Quan el cultiu arriba a una alta confluència és es poden diferenciar les cèl·lules. Cal canviar el medi OPC pel medi de diferenciació, el qual porta T3, forskolina i CNTF, i incubar les cèl·lules amb aquest nou medi durant 3-5 dies.

3.3.3 Tractaments aplicats als cultius primaris d'astròcits i d'oligodendròcits

En estudis previs del grup, fets per la Dra.Tania López, s'havia determinat que en certes condicions la proteïna GlialCAM tenia un efecte específic i es podia concentrar més en les unions astrocitàries. Per aquesta raó, s'han continuat aquests estudis i s'han determinat uns tractaments concrets per a poder estudiar la relació funcional entre MLC1, GlialCAM i CIC-2.

- Materials i reactius

- Astròcits i oligodendròcits de rata i ratolí diferenciats

- 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 d'aigua.

- Solució d'alt contingut de potassi:60 mM NaCl, 60 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 d'aigua.

- Metodologia

1. Els astròcits sembrats en plaques de 6 i 24 pous, i oligodendròcits sembrats en plaques de 24 es tracten amb les solucions fisiològica i d'alt contingut de potassi durant 6 hores. Després les cèl·lules són processades per a fer WB i immunofluorescència.

3.3.4 Visualització de vacuoles mitjançant *Calcein AM*

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.

Aquest marcador s'utilitza normalment per a dur a terme experiments d'*imaging* ja que ajuda a poder visualitzar canvis en el cultiu cel·lular.

En la present Tesi s'ha utilitzat per a poder detectar si els astròcits del ratolí *knock-out* presentaven o no vacuoles.

- Materials i reactius

- Astròcits KO i WT diferenciats 3 setmanes amb AraC

- *Calcein AM* (Sigma) 2µM

- 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 d'aigua

- Metodologia

1. S'agafen cèl·lules necessàries i es passen a una altra placa de 24 pous on hi ha solució fisiològica.

2. Després les cèl·lules s'incuben durant 10 minuts amb la calceïna 2µM en medi fisiològic, tapades de la llum.

3. El cubreobjectes es monta en una camareta per tal de poder visualitzar les cèl·lules *in vivo*. Cal posar-hi una mica de solució fisiològica a sobre per tal que no s'assequin les cèl·lules.

4. S'observen les cèl·lules en el microscopi invertit de fluorescència *Olympus DSU amb spinning disk* i es fan fotos de diferents regions dels cubreobjectes.

3.4 AMPLIFICACIÓ I OBTENCIÓ D'ADENOVIRUS

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 linear 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.

Degut a la dificultat de transfectar astròcits primaris de rata, en els darrers anys en el nostre laboratori s'han produït adenovirus que expressessin 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.

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 divisòries com en les no divisòries. 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.

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 (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 del 80-100%, es recull el medi i les cèl·lules (cru viral) i es transfereixen a un tub de 15 ml ben resupeses. 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 r.p.m per tal d'eliminar les restes cel·lulars.

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 eppendorf.

4. 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.

3.4.2 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.

- Metodologia per adenovirus que expressen una proteïna fluorescent

1. Es sembren 30.000 cèl·lules HEK 293 en una placa de 96 pous. Cada pou ha de tenir un volum final de 100 µl.

2. La placa s'incuba a 37°C durant 6-8 hores.

3. Infectar les cèl·lules amb molt de compte ja que les HEK tenen una baixa adherència. En el primer pou s'hi addiciona 10 µl de virus i es fan dilucions successives a partir del primer pou. Cal canviar la punta a casa pou per tal d'evitar errors de pipeteig.

4. Al matí següent s'ha de canviar el medi.

5. Per a poder titular es fa és el següent: fer una foto de cada dilució amb el filtre GFP del microscopi *Olympus DSU amb spinning disk*. Imprimir les fotos i contar el nombre de cèl·lules verdes (infectades) que hi ha per foto. El títol es calcula amb la següent fórmula i es dona en Transduction Units/ml (TU/ml):

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

- Metodologia per adenovirus que no expressen una proteïna fluorescente

En aquest cas cal seguir els mateixos passos però per a poder titular cal fer una immunocitoquímica ja que no podem veure els virus directament.

1. Retirar el medi de la placa i deixar-la assecar durant 2-5 minuts a temperatura ambient.
2. Afegir 100 µl de metanol fred i incubar a -20°C durant 10 minuts.
3. Aspirar el metanol i rentar les cèl·lules dues vegades amb 100µl de PBS 1X.
4. Incubar durant 1-2 hores amb anticòs primari (1/100) en un volum final de 50 µl/pou de PBS 1X + 1% BSA. Cal que estigui tapat de la llum.
5. Rentar 3 cops amb PBS1X+1%BSA.
6. Incubar durant 1-2 hores amb anticòs secundari (1/300) en un volum final de 50 µl/pou de PBS 1X + 1% BSA. Cal que estigui tapat de la llum.
7. Rentar 3 cops amb PBS 1X
8. Fer fotos en el microscopi *Olympus DSU amb spinning disk* i fer el comptatge de la mateixa manera que abans.

3.5 TRANSDUCCIÓ D'ASTRÒCITS AMB ADENOVIRUS

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

1. 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), 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.

2. 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.

4.TÈCNiques RELACIONADES AMB L'HISTOLOGIA

Les tècniques histològiques com són, per exemple, la immunohistoquímica o la microscòpia electrònica, es duen a terme en estudis d'anatomia patològica i biologia cel·lular per tal d'estudiar la localització d'una proteïna. En el nostre cas s'ha estudiat la localització de MLC1, GlialCAM i CIC-2 en diferents mostres de teixit, així com les modificacions a nivell tissular o les característiques de la patologia MLC.

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

4.1 OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE TEIXITS

4.1.1 Obtenció dels teixits: Cervell, cerebel, medul·la espinal i retina

Per extreure el cervell, el cerebel, la medul·la i la retina, primerament s'obre el crani per la seva part superior amb l'ajuda d'unes tisores de dissecció, fins a descobrir el cervell. Es realitzen uns petits talls als costats per tal de no danyar els teixits. Passant unes pinces per sota del cerebel i amb compte, s'extreu el cervell, cerebel i medul·la espinal.

A) Cervell, cerebel i medul·la espinal: Per a l'obtenció de teixits per a realitzar estudis de WB, s'han utilitzat ratolins d'entre edats post-natals (P0-P2) fins a edats adultes. Els animals recent nascuts s'adormen en gel. Els animals adults es sacrifiquen en CO₂ i s'extreuen els teixits ràpidament i es guarden en neu carbònica.

Per obtenir la retina, s'extreu l'ull des de la conca ocular amb molt de compte, incolent el fragment de nervi òptic contigu a ell.

B) Retina : S'han realitzat estudis de localització en retina en ratolins adults.

4.1.2 Fixació dels teixits

- Materials i reactius
 - Material de cirurgia (tisores, pinces de microcirurgia i micropinces tallants).
 - PFA 4% en PBS 1X pH 7.4
 - Isofluorà
 - Sacarosa

- Bomba de perfusió

- Metodologia

A) Cervell, cerebel i medul·la espinal: Primerament l'animal s'anestèsia amb isofluorà. Quan l'animal està anestesiats s'immobilitza de manera que la caixa toràcica quedi accessible. Seguidament, s'efectua una escisió de manera que la caixa toràcica queda descoberta i es disecciona l'esternó fins arribar al cor. És fa una petita escisió en l'aurícula dreta i una petita escisió en el ventricle esquerra, per a poder introduir una cànula acoblada a la bomba de perfusió. D'aquesta manera el PFA 4% es bombejat de manera constant a través del sistema circulatori de l'animal i els diferents teixits són fixats. Després s'extreuen els teixits que interessin i es post-fixen durant 24 hores amb el mateix PFA 4%.

B) Retina : Quan s'ha extret l'ull es submergeix en PFA 4% i es fa una punxada en la *ora serrata* i es deixa que es fixi durant 3 minuts. Passat aquest temps és fa una escisió a través de la *ora serrata* per tal d'eliminar la còrnea. Es deixa fixant 15 minuts més. Després s'elimina la lent, evitant que hi hagi despreniment. La lent es passa a un tub amb 2 ml de PFA 4% i es deixa durant 2 hores en agitació.

4.1.3 Crioprotecció, inclusió i tall

- Materials i reactius

- Sacarosa al 15% i al 30% en PBS 1X.

- O.C.T. (TissueTek)

- Nitrogen líquid

- Criostat (Leica)

- Metodologia

A) Cervell, cerebel i medul·la espinal: Passades aquestes 24 hores els teixits es passen a un tub amb Sacarosa 30% en PBS per eliminar l'excés de PFA 4% i d'aquesta manera el teixit queda totalment protegit gràcies a la solució crioprotectora.

B) Retina: Passades les 2 hores de fixació, se li fan 3 rentats al teixit de 10 minuts amb PBS 1X. Després es deixa en sacarosa 15% durant 15 minuts. Passat aquest temps, el teixit es traspasa a un tub amb sacarosa 30% i es deixa tota la nit a 4°C.

Els teixits crioprotegits són inclosos en un motlle on hi ha una solució especial per efectuar talls per congelació, O.C.T. Aquests motlles són congelats dins d'un recipient en contacte amb nitrogen líquid. Els motlles un cop congelats es guarden a -80°C .

Per a tallar els blocs es va utilitzar un criostat (Leica). Aquest aparell conté un microtom situat al seu interior i que es troba a una temperatura entre -18°C -20°C i manté congelat el bloc sense que es danyi el teixit. Els cervell, cerebel i medul·la es van tallar amb un gruix d'entre 30-40 μm . En el cas de la retina, els talls van ser de 15 μm .

En el cas dels talls de retina, aquests es van montar directament en portaobjectes els quals es van gelatinitzar. Per a preparar-los cal gelatina al 5% en aigua Milli-Q en continua agitació i escalfant-ho a 40°C per aconseguir una completa homogenització. Seguidament, s'hi submergeixen els portaobjectes durant uns segons i posteriorment es deixen assecar durant tota la nit a temperatura ambient.

4.2 TÈCNiques D'IMMUNOLocalITZACIÓ

Les tècniques d'immunolocalització es basen en la capacitat dels anticossos d'unir-se específicament als seus corresponents antígens. La reacció específica antígen-anticòs només es visible si l'anticòs està marcat amb una substància que, a partir d'una reacció enzimàtica, produeix coloració, emet llum, o es tracta d'un fluoròfor que absorbeix llum a una determinada longitud d'ona i emet a una longitud d'ona major.

4.2.1 Immunohistoquímica: Mètode del complex estreptavidina-biotina (ABC)

Aquesta tècnica es basa en la forta afinitat entre la biotina i l'avidina/estreptavidina. L'anticòs secundari és el que es troba marcat amb la biotina.

- Materials i reactius
 - Placa de cultius de 24 pous.
 - Pinzell.
 - Portaobjectes i cobreobjectes.
 - PBS 1X.
 - PB 0,4M.
 - Solució inhibidora de peroxidasa endògena (2% H_2O_2 , 10% metanol, PBS 1X).

- PBS-tritó X-100 (0,3-0,5%).
- Solució de bloqueig (PBS 1X, 10% sèrum normal de cabra (NGS), 0,3-0,5 % tritó).
- Anticossos primaris (dilució 1/100 en solució de bloqueig)
- Anticòs secundari biotinilat (dilució 1/200 en solució de bloqueig).
- Complex Streptavidina-peroxidasa (dilució 1/400 en solució de bloqueig).
- DAB 1% (Sigma).
- Lupa.
- Mowiol.

- Metodologia

1. S'escullen les llesques de teixit que es volen i s'introdueixen en els pous de la placa de cultius.
2. Es fan 3 rentats amb PBS1X
3. A continuació s'incuba el teixit amb la solució inhibidora de peroxidada endògena durant 10 minuts. Cal que no es sobrepassi aquest temps ja que aquesta solució és molt agressiva pel teixit.
4. Es fan 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X per eliminar l'excés de solució inhibidora.
5. Seguidament es realitza la permeabilització del teixit. Depenent del tipus de mostra s'utilitza una concentració de tritó o una altra. Per a teixit de ratolí adult s'utilitza tritó X-100 0,3% en PBS1X i si el teixit és d'humà s'utilitza tritó X-100 0,5 % en PBS 1X.
6. Incubació amb la solució de bloqueig durant 2 hores a temperatura ambient i en constant agitació. Cal fer el bloqueig amb un sèrum de diferent animal del que s'ha extret l'anticòs primari per evitar interaccions inespecífiques.
7. Incubació de l'anticòs primari diluït amb solució de bloqueig a 4°C durant tota la nit.
8. Atemperar les mostres durant 30 minuts. Seguidament s'efectuen 3 rentats de 10 minuts amb solució de permeabilització.
9. S'incuba l'anticòs secundari biotinilat diluït amb solució de bloqueig durant 1 hora. Aquest anticòs ha d'unir-se específicament a les cadenes pesades de l'anticòs primari i per tant ha

de venir d'un animal diferent. En aquest treball s'ha utilitzat l'anticòs *goat anti-rabbit* (Vector Laboratories).

10. S'efectuen 3 rentats amb solució de permeabilització i seguidament s'incuba el complex avidina/streptavidina-biotina-peroxidasa (Amersham) a dilució 1/400 durant 2 hores a temperatura ambient. Cal que es mantigui fora de la llum.

11. Es fan 3 rentats amb solució de permeabilització i 3 rentats més amb PBS 1X.

12. A continuació es dur a terme el revelat mitjançant la reacció de dos reactius:

El substrat de la peroxidasa (H_2O_2): 1% en PB

La diaminobenzimida (DAB) 1% : 0,03 % en PB

Per a cada ml de DAB 0,03 % en la mostra, s'afegeix 2 μ l de 1% H_2O_2 . Cal extremer les condicions de treball amb la DAB ja que és un compost molt tòxic.

13. Quan les mostres aconseguen una tonalitat marronosa es para la reacció afegint PBS 1X i es fan 3 rentats de 10 minuts.

14. El teixit es monta sobre un portaobjectes i s'elimina l'excés de PBS 1X amb molt de compte amb l'ajuda d'un pinzell i sota la lupa.

15. S'afegeix una gota de Mowiol sobre el teixit i s'hi posa un cobreobjecte a sobre.

16. Les mostres ja estan preparades per a ser observades en el microscopi òptic.

4.1.2 Immunoflorescència per talls gruixuts

Els anticossos utilitzats en aquesta tècnica estan marcats amb un fluorocrom. Interessa poder detectar diferents proteïnes en la mateixa mostra i en aquest cas podem fer dobles o triples marcatges utilitzant colors diferents per a la detecció.

- Materials i reactius

- Placa de cultius de 24 pous.

- Pinzell.

- Portaobjectes i cobreobjectes.

- PBS 1X.

- PBS-tritó X-100 (0,3-0,5%, solució de permeabilització).

- Solució de bloqueig (PBS 1X, 10% sèrum normal de cabra (NGS), 0,3-0,5 % tritó).
- Anticossos primari (dilució 1/100 en solució de bloqueig).
- Anticossos secundaris (Alexas 488 i 568, dilució 1/500 en solució de bloqueig).
- Medi de montatge : Mowiol/Vectashield.
- Lupa.

- Metodologia

1. Preparació de les mostres en una placa de cultiu de 24 pous. Es fa un rentat ràpid amb PBS 1X.
2. A continuació, es realitzen 2 rentats de 10 minuts amb PBS 1X.
3. Després es fan 3 rentats més. Aquest cop amb la solució de permeabilització
4. Les mostres es bloquegen durant 1-2 hores a temperatura ambient i en constant agitació. Afegim uns 300-500 µl de solució de bloqueig per pou.
5. Les mostres s'incuben amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C. Cal que hi hagi un volum entre 300-500 µl per pou.
6. Deixem atemperar la placa durant 30 minuts i a continuació se li fan 3 rentats de 10 minuts amb solució de permeabilització.
7. Incubació amb l'anticòs secundari durant 2 hores a temperatura ambient i tapat de la llum.
8. Les mostres es renten 3 cops amb PBS 1X i seguidament es monten sobre els cobreobjectes amb l'ajuda d'un pinzell i sota una lupa, per tal que no quedin plecs en el teixit.
9. Les mostres són observades amb els objectius de 60x i 20x en el microscopi confocal *Nikon Eclipse Ti*.

4.1.2 Immunoflorescència per talls fins

Aquest tipus d'immunofluorescència s'utilitza per a talls menors de 30 µm. El procediment és similar però cal fer-lo tot a sobre dels talls, els quals ja estan montats en portaobjectes gelatinitzats. És molt important crear un entorn hidrofòbic al voltant dels talls amb un llapis especial (PAP-PEN, Sigma) i mantenir els portaobjectes en una càmera humida durant tot el procès.

4.3 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

La tècnica de microscòpia electrònica utilitza electrons per a formar imatges d'objectes diminuts. Els microscopis electrònics permeten treballar amb augments molt superiors als microscopis convencionals (fins a 500.000 augments) degut a que la longitud d'ona dels electrons és més baixa que la dels fotons. Aquest tipus de microscopi funciona amb un feix d'electrons accelerat per un alt voltatge i focalitzats a través de lents magnètiques. L'amplificació de l'imatge es produeix a partir d'un conjunt de lents que formen una imatge sobre una placa fotogràfica o sobre una placa sensible a l'impacte d'electrons que transfereix la imatge ja formada a la pantalla de l'ordinador.

El mètode de fixació utilitzat per als teixits processats per aquesta tècnica és la perfusió en ratolins adults. La solució fixadora que s'ha d'utilitzar en aquest cas ha de ser: PFA 4%, gluteraldehid 0,1 % i CaCl 0,5 % en PB 0,1 M. S'utilitza aquest també ja que preserva millor les estructures cel·lulars.

El processament de les mostres analitzades per aquesta tècnica va ser desenvolupat pel Dr. Albert Martínez del Departament de Biologia cel·lular de la Universitat de Barcelona i pel Dr. Isidre Ferrer del Departament d'Anatomia Patològica de la Universitat de Barcelona.

5. GENERACIÓ DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT* CONDICIONAL PER *Mlc1*

El fet de desconèixer la funció de la proteïna MLC1 dificulta molt el poder avançar en l'estudi d'aquesta leucoencefalopatia. Per aquesta raó es va decidir generar un ratolí *knock-out* condicional per *Mlc1*.

5.1 DISSENY DE L'ESTRATÈGIA

La primera part de generació del ratolí condicional es va dur a terme a l'ICS (*Institut Clinique de la Souris*, Strasbourg). Anteriorment s'havia intentat generar en el laboratori però no va ser possible degut a la complexitat del mètode.

L'estratègia es va basar en el mètode Cre/loxP (Bouvier and Cheng, 2009). Mitjançant l'introducció de seqüències loxP, en que es van flanquejar els exons 2 i 3.

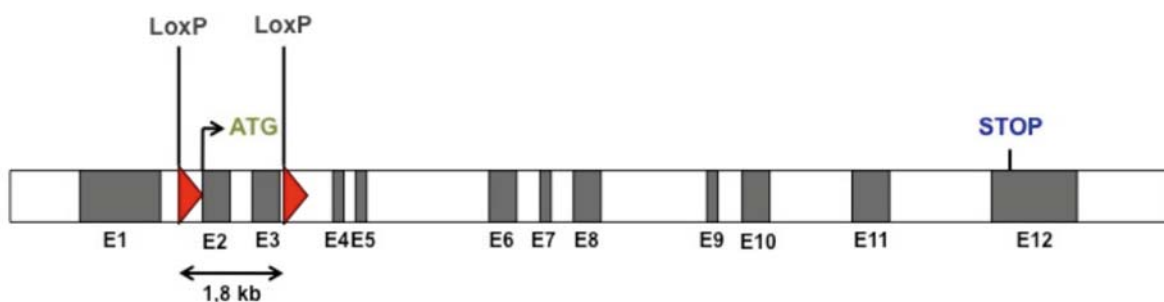


Figura 24. Esquema de l'estratègia per a generar el ratolí *knock-out* condicional per *Mlc1*. En vermell s'observa la situació de les seqüències loxP. La distància entre les dues seqüències és de 1,8 kbases. En gris es representen els exons (E) amb el codó d'inici ATG, en verd, i el codó STOP en blau.

5.2 GENERACIÓ DE LA COLÒNIA DE RATOLINS *KNOCK-OUT* DE *Mlc1*

Per a poder obtenir la nostra colònia MLC es van fer una sèrie de creuaments per tal de poder obtenir els animals necessaris per als experiments.

Així doncs, el primer que es va fer va ser creuar el ratolí que provenia de l'ICS amb un ratolí que contenia la recombinasa Cre, per tal d'introduir la Cre i d'aques manera poder "tallar" la regió entre l'exó 2 i 3, lloc on estaven localitzades les seqüències loxP. En aquest punt s'havia obtingut la generació d'animals F0.

Quan s'havia obtingut un ratolí el qual havia incorporat la Cre, aquest es creuava amb un ratolí C57Bl6. El següent pas era eliminar la recombinasa i obtenir la generació F1. D'aquesta F1 es seleccionaven els animals que eren heterozigots, els quals ja havien

eliminat la Cre, i es creuaven amb altres heterozigots. Els animals que sorgien d'aquest últim creuament serien la generació F2 i s'obtenien els 3 genotips possibles: *wild-type*, heterozigot i *knock-out*. Aquests serien els animals amb els que es realitzarien els experiments (Figura 25).

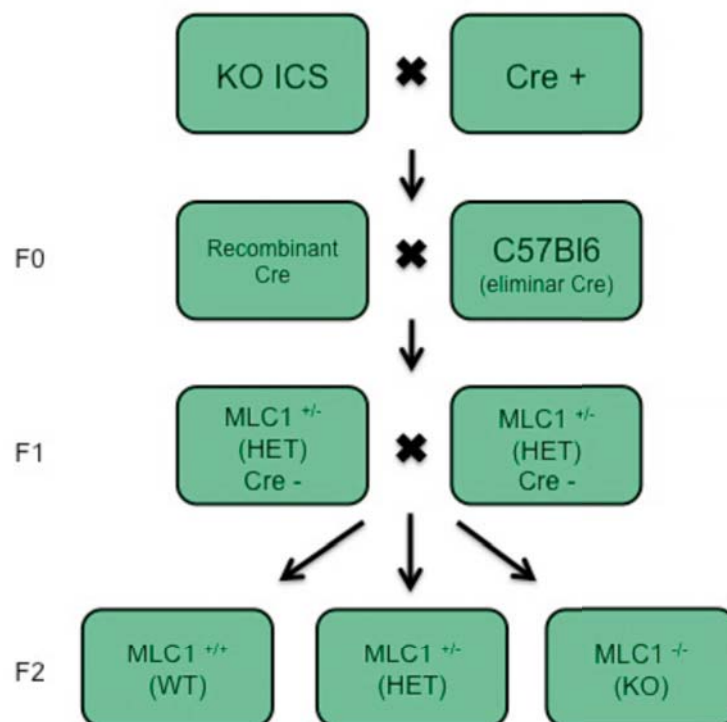


Figura 25. Esquema de la generació de la colònia d'animals *knock-out* de *Mlc1*. S'esquematitza els diferents creuaments generats per a l'obtenció dels animals de la generació F2. WT: *wild-type*; HET: heterozigot; KO: *knock-out*.

5.3 GENOTIPATGE DELS ANIMALS

5.3.1. Extracció de DNA

Per a extreure DNA i saber si els animals són *wild-type*, *knock-out* o heterozigots seguim el següent procediment.

- Materials i reactius

- Tubs eppendorfs.
- Ganivetes.
- NaOH 50mM.
- Tris 1M.
- Nanodrop.

- Metodologia

1. Es talla una petita part de cua dels animals (0,3-0,5 cm) i es diposita en un eppendorf.
2. Extracció del DNA. Primerament s'afegeixen 100 µl de NaOH 50 mM.
3. Tot seguit s'incuba a 99°C durant uns 30 minuts. Cal que estigui en agitació.
4. Es neutralitza amb Tris 1M.
5. Es centrifuga durant 10 minuts a 13.000 r.p.m.
6. Es recull el sobrenedant i es quantifica la concentració en el Nanodrop.

5.3.2 PCR del genotipatge

Per a fer les PCRs dels genotipatges s'han utilitzat diferents *primers*:

#608-Lf (LF): CTGAATCTAGATGAGTTTGGGTGGC (25pb)

#610-Lr (LR): GAAAACCCTCTAATTGTAGTAAGTG (25pb)

#609-lr (LR2): GCACCACAGCACCACAACATGC (22pb)

Aquests *primers* s'han aparellat segons si era per a detectar la banda *knock-out* o la banda *wild-type*. Així doncs, les parelles de primers per a les PCRs són les següents:

#608/#610 : PCR banda WT (243 pb)

#608/#609: PCR banda KO (338 pb)

<u>PCR WT</u>	<u>PCR KO</u>
Tampó Polimerasa (10X) 1 µl	Tampó Polimerasa (10X) 1 µl
dNTPs (1,25 mM) 0,3 µl	dNTPs (1,25 mM) 0,3 µl
MgCl ₂ (50 mM) 0,3 µl	MgCl ₂ (50 mM) 0,3 µl
<i>Primer Lf</i> (forward) (5 µM) 0,5µl	<i>Primer Lf</i> (forward) (5 µM) 0,5µl
<i>Primer Lr</i> (reverse) (5 µM) 0,5 µl	<i>Primer lr</i> (reverse) (5 µM) 0,5 µl
DNA (50 ng) 1 µl	DNA (50 ng) 1 µl
Taq Bio Therm 0,15 µl	Taq Bio Therm 0,15 µl
Aigua Milli-Q 6,25 µl	Aigua Milli-Q 6,25 µl
Volum final 10 µl	Volum final 10 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.

Així doncs, per la *Taq Bio Therm* el programa que s'ha utilitzat és el següent:

Inici: 5 minuts a 94°C

Desnaturalització: 20 segons a 94°C

Hibridació: 30 segons a 60°C

Elongació: 1minut a 72°C

Elongació final: 7 minuts a 72°C

Finalment es deixa a 4°C

} 30 cicles

Quan la PCR ha finalitzat es fa un gel d'agarosa al 2% i es fa l'electroforesi de 4 µl del producte de PCR juntament amb 1 µl del tampó 6X. L'electroforesi es deixa córrer durant uns 20 minuts a 120 kV.

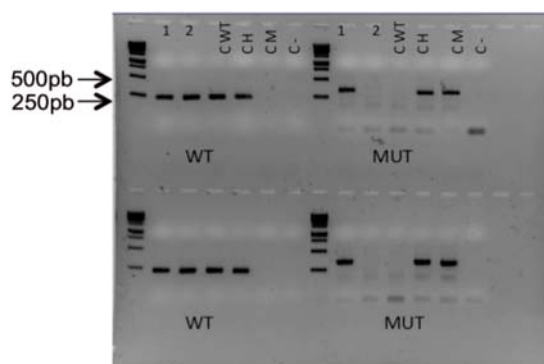


Figura 26. Exemple d'un gel d'agarosa on es mostra les bandes obtingudes a partir de la PCR del genotipatge. S'observen les diferents bandes que corresponen als diferents genotips que poden tenir els animals. Es mostren els controls utilitzats. C: control; C-: control negatiu; WT: *wild-type*; MUT: *knock-out*; H: heterozigot.

ANNEX 1: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL

AMPICIL·LINA

Es dissol l'ampicil·lina en aigua Milli-Q a 100 mg/ml, es filtra a 0,22 µm i es guarda 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 d'àcid coumàric 90 mM, 250 µl de 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.

ANNEX 2: CONTRUCCIONS 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.

<u>ENTRY CLONES</u>	<u>EXPRESSION CLONES</u>
HA-MLC1S69L-HA loop B1B2	HA-MLC1S69L-HA loop pcDNA3
GlialCAM EmGFP B1B2	Split 1 HA-MLC-HA pcDNA3
EmGFP B1B5R	Split 2 HA-MLC-HA pcDNA3
zCIC-2 B1B5R	GlialCAM-EmGFP pcDNA3
zCIC-K B1B5R	GlialCAMR92Q-EmGFP pcDNA3
zCIC-K B5B2	GlialCAMR92W-EmGFP pcDNA3
zCIC-K B1B5R	zGlialCAMa-Flag pcDNA3
GFAP B1B5R	zGlialCAMb-Flag pcDNA3
β -globin B5B4	zGlialCAMaG89S-Flag pcDNA3
GlialCAM-EmGFP B4RB3R	zGlialCAMaG89D-Flag pcDNA3
Hgh pA B3B2	zGlialCAMaD128N-Flag pcDNA3
	zGlialCAMa-HA pcDNA3
	zCIC-2a-Flag pcDNA3
	zCIC-2b-Flag pcDNA3
	zCIC-2c-Flag pcDNA3
	HA-zBart pcDNA3
	zBart-HA pcDNA3
	EmGFP-zCICK pcDNA3
	zCICK-EmGFP pcDNA3

RESULTATS

CAPÍTOL 1.

CARACTERITZACIÓ DEL MODEL DE RATOLÍ

KNOCK-OUT PER *Mlc1*

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica MLC és una malaltia rara que afecta principalment la integritat de la mielina causant un quadre clínic característic en els pacients, principalment marcat per la presència de vacuoles i per la manifestació de macrocefàlia durant el primer any de vida (van der Knaap et al., 2012).

El primer gen descrit de la malaltia va ser *MLC1* (MIM #604004) el qual s'ha trobat mutat en el 75% dels pacients afectats (Ilja Boor et al., 2006). Recentment, en el nostre grup de recerca, es va descriure un segon gen implicat en aquesta malaltia anomenat *GLIALCAM* (MIM#611642) (López-Hernández et al., 2011a).

La dificultat d'estudi que presenta la fisiopatologia MLC per ser una malaltia rara, va fer plantejar l'objectiu de generar un model animal per poder avançar en la investigació. Fins al moment només s'havia pogut treballar amb models *in vitro*, com són els models *knock-down* generats mitjançant RNA d'interferència per a *MLC1* i per a *GlialCAM* utilitzats en cultius primaris d'astròcits de rata i generats en el grup (Capdevila-Nortes et al., 2013; Duarri et al., 2011).

Aquest capítol s'ha desenvolupat en dues parts ja que per una banda s'ha caracteritzat el model de ratolí *knock-out* per la malaltia i per l'altra s'han caracteritzat les cèl·lules astrocitàries derivades d'ell.

PART 1: MODEL ANIMAL

1. GENERACIÓ DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT* CONDICIONAL PER AL GEN *Mlc1*.

Quan es va començar el projecte de la generació del model de ratolí *knock-out* per *Mlc1*, primerament es va intentar desenvolupar en el laboratori però al sorgir diferents problemes es va decidir generar el ratolí *knock-out* a l'*Institut Clinique de la Souris* (Strasbourg, França).

L'estratègia que es va seguir per a dissenyar aquest model animal es va basar en el sistema Cre-Lox P (Bouvier and Cheng, 2009). Es van flanquejar els exons 2 i 3 del gen *Mlc1* mitjançant la incorporació de seqüències loxP, perquè en l'exó 2 es troba el codó d'inici de la traducció (Figura 24, Capítol 5 de Materials i Mètodes). Es va triar aquesta regió per tenir més possibilitat d'eliminar per complet la proteïna, ja que els exons 2 i 3 es troben *in frame* i a banda codifiquen pel primer i segon segment transmembrana. Per tant, flanquejar aquesta regió permetria eliminar la funcionalitat de la proteïna.

Així doncs, en primer lloc es va buscar (a partir de bases de dades) un BAC adequat (RP24-467419), que acotés la regió de *Mlc1*, i un vector recombinant on es pogués clonar el constructe.

El vector de recombinació havia d'incorporar regions homòlogues a banda i banda del gen que permetessin dirigir la recombinació homòloga a les cèl·lules ES (cèl·lules embrionàries). El constructe va constar del *cassette* FRTNeoFRT, el qual incorporava un braç homòleg 5', amb les seqüències loxP, i un braç homòleg 3'. Per tal de poder realitzar una selecció positiva i poder aïllar els clons que havien incorporat la modificació genètica, el constructe també havia d'incloure el gen *Neo*, el qual es troba sota control del promotor de la fosfoglicerat quinasa-1 (PGK-1).

El següent pas va ser electroporar les cèl·lules ES amb el constructe que incorporava el gen *Neo* i els llocs loxP. Els clons positius aïllats es van analitzar per PCR, per Southern Blot i finalment es van cariotipar.

Es van obtenir 4 ratolins quimeres, és a dir, 4 animals que havien incorporat les cèl·lules ES amb la modificació correcta. Aquests animals es distingien pel seu pelatge marró degut a la barreja de les dues soques, la 129Sv de caràcter *agouti* (marró) degut a les cèl·lules ES i la C57bl6 de pelatge negre degut als blastòcits. Posteriorment les quimeres es van creuar amb el ratolí Flp de la soca C57bl6 per tal d'eliminar el *cassette* *Neo*, ja que la recombinasa Flp reconeix els llocs FRT. El pas següent va ser creuar l'animal que havia eliminat el *cassette* i que incorporava les seqüències loxP, anomenat ratolí *floxed*, amb un ratolí que expressava la recombinasa Cre a tot arreu (Figura 25, Capítol 5 de Materials i Mètodes). La descendència obtinguda havia eliminat la regió que coprenien els exons 2 i 3. Posteriorment, aquests animals que havien eliminat els exons 2 i 3 i que eren Cre⁺, es van creuar amb ratolins de la soca C57bl6 per tal d'eliminar la Cre. Els animals obtinguts d'aquest darrer creuament eren heterozigots, els quals es van creuar entre ells per a poder generar la colònia MLC1.

1.1 LA COLÒNIA MLC1

La colònia de ratolins MLC1 generada es va mantenir en l'estabulari SPF de l'IDIBELL sota les condicions òptimes d'esterilitat i neteja segons la normativa vigent (seguint les especificacions de la AAALAC).

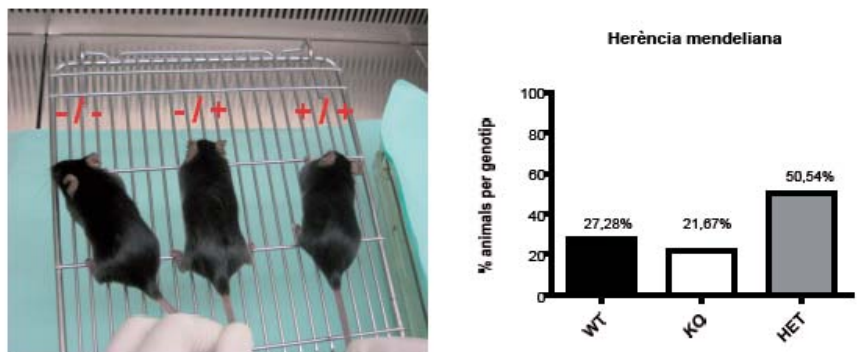


Figura 27. Animals F2 de la colònia MLC1. Genotips WT (+/+), KO (-/-) i HET (+/-). Es representa gràficament l’herència mendeliana dels d’animals existents en la colònia de ratolins: WT= 309; KO=241; HET=562.

Els animals corresponents a la generació F2 de la colònia i que van ser utilitzats per a realitzar aquest treball van ser un total de 1112 animals els quals presentaven els diferents genotips *wild-type* (WT), *knock-out* (KO) i heterozigots (HET). És van obtenir 309 animals WT, 241 animals KO i 562 animals heterozigots. Els percentatge obtingut de cada genotip seguia una herència mendeliana confirmant que els animals mancats del gen *Mlc1* eren viables i fèrtils (Figura 27).

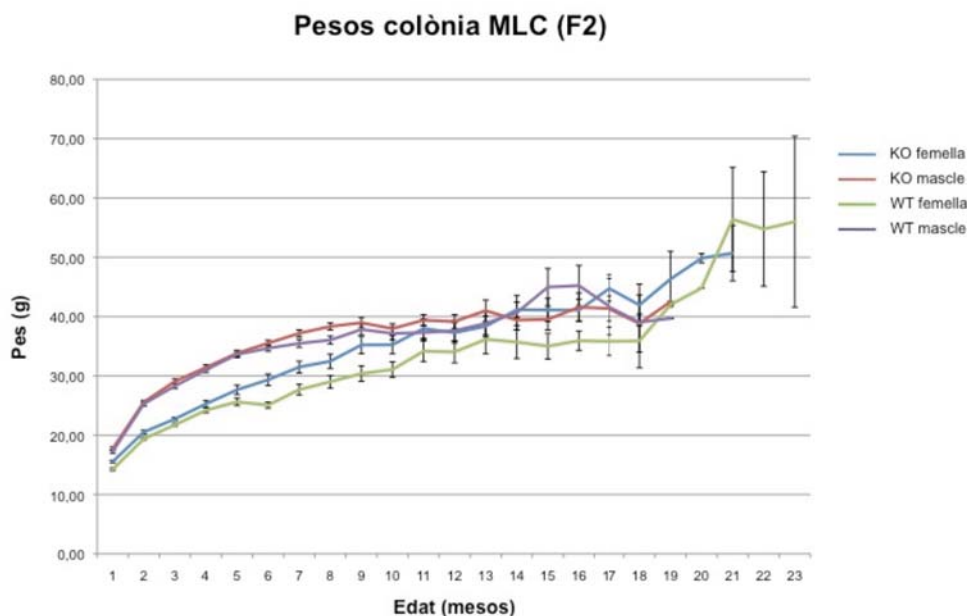


Figura 28. Seguiment del pes dels animals F2 de la colònia MLC1. Gràfica representativa dels pesos d’alguns animals (mascles i femelles) a diferents mesos d’edat. WT: *wild-type*; KO:*knock-out*.

Els ratolins de la colònia MLC1 van ser controlats periòdicament. Tot i que a la figura 28 es mostra que els mascles, tant dels animals *wild-type* com dels animals *knock-out*, tenien un pes major a les femelles i que els animals *knock-out* mostraven sempre un major pes

respecte els *wild-type*, tant en femelles com en mascles, aquestes diferències no eren significatives.

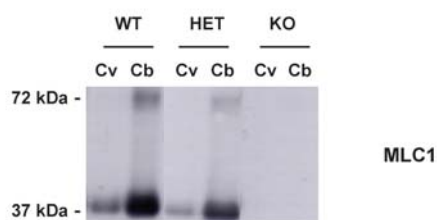
1.2 ANÀLISI DE LA DEFICIÈNCIA DE LA PROTEÏNA MLC1

El primer pas per a la caracterització de la colònia *knock-out* era l'estudi de l'expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB i RT-PCR, per tal de verificar que aquesta havia estat eliminada per complet.

Per a realitzar els estudis d'expressió de la proteïna MLC1 en el model *knock-out*, es van utilitzar els animals F2 de la colònia. Els animals ja s'havien genotipat prèviament i, per tant, se sabia quin fenotip tenien però calia estudiar si realment la generació del *knock-out* eliminava per complet la proteïna. Primerament, mitjançant WB, es va realitzar un anàlisi de MLC1 a partir d'un extracte total de proteïna. Es van utilitzar mostres de cervell i de cerebel de cada fenotip. Es va poder observar l'absència de la proteïna MLC1 en els animals *knock-out* respecte els animals *wild-type* i els heterozigots (Figura 29 A). Aquests primers resultats mostraven que als animals *knock-out* els mancava la proteïna MLC1.

En paral·lel també es van estudiar els nivells de RNA missatger mitjançant RT-PCR. Es van utilitzar dues parelles de *primers*. Primer, es va realitzar una PCR utilitzant uns *primers* que amplificaven una regió compresa entre els exons 4 i 5. En el *knock-out* es va observar que hi havia una senyal similar a la que s'observava a la mostra de l'heterozigot, indicant que el mRNA no es degradava. Després es va realitzar una altra PCR utilitzant uns *primers* que, en aquest cas, amplificaven la regió compresa entre els exons 2 i 3 (regió del gen eliminada en la generació del *knock-out*). Aquesta segona PCR no mostrava senyal de RNA. Aquests resultats indicaven que l'al·lel mutant es transcrivía, que el mRNA no es degradava i que aquest mRNA es trobava mancat dels exons 2 i 3 del gen. Aquests experiments van ser realitzats pel Dr. Miguel López de Heredia (IDIBELL).

A)



B)

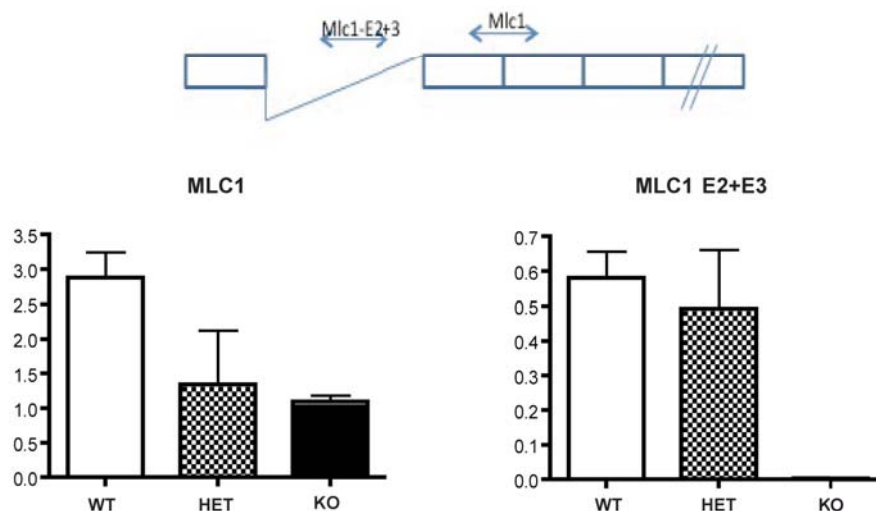


Figura 29. Deficiència de la proteïna MLC1. A) Anàlisi de la proteïna MLC1 mitjançant estudis de WB en extractes cervell i cerebel d'animals WT, KO i HET. Es detecta MLC1 utilitzant un anticòs contra la part N-terminal. B) Estudi dels nivells de mRNA mitjançant RT-PCR, utilitzant diferents parelles de primers. *Mlc1*: amplifica la regió compresa entre els exons 4 i 5. *Mlc1* E2+E3: amplifica la regió compresa entre els exons 2 i 3). Cv: cervell; Cb: cerebel; WT: *wild-type*; KO: *knock-out*; HET: heterozigot.

Un altre factor important era saber si per a realitzar els experiments previstos per a la caracterització del model es podien utilitzar tant els mascles com les femelles.

Mitjançant estudis de WB es va poder comprovar que tant els mascles com les femelles *wild-type* mostraven nivells d'expressió de proteïna MLC1 similars, tant en els extractes de cervell com en els extractes de cerebel. Els extractes de teixits dels animals *knock-out* mostraven la manca de la proteïna en ambdós sexes (Figura 30). Així doncs, a partir d'aquest moment els animals utilitzats per a la caracterització de la colònia *knock-out* per *Mlc1* serien dels dos sexes a excepció dels experiments de comportament, ja que per possibles efectes hormonals s'acostumen a utilitzar només els mascles.

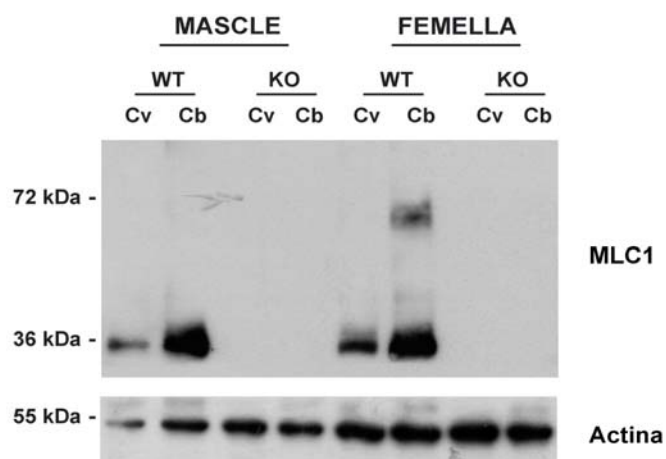


Figura 30. Estudi de la proteïna MLC1 segons el sexe. Estudi de la proteïna MLC1 en mascles i femelles mitjançant WB utilitzant extracte total de proteïna obtinguda del cervell i del cerebel en animals WT i KO. Es detecta MLC1 utilitzant un anticòs contra la part N-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Cv: cervell; Cb: cerebel; WT: *wild-type*; KO: *knock-out*.

El Dr. Oscar Teijido, antic membre del grup, també havia realitzat estudis de l'expressió de la proteïna MLC1 en diferents teixits de rata els quals havien donat negatius a excepció dels que ja s'havien descrit. En el cas del ratolí *knock-out* també es van realitzar estudis de l'expressió de la proteïna a diferents teixits per tal de comprovar que realment la proteïna MLC1 només s'expressa en el sistema nerviós.

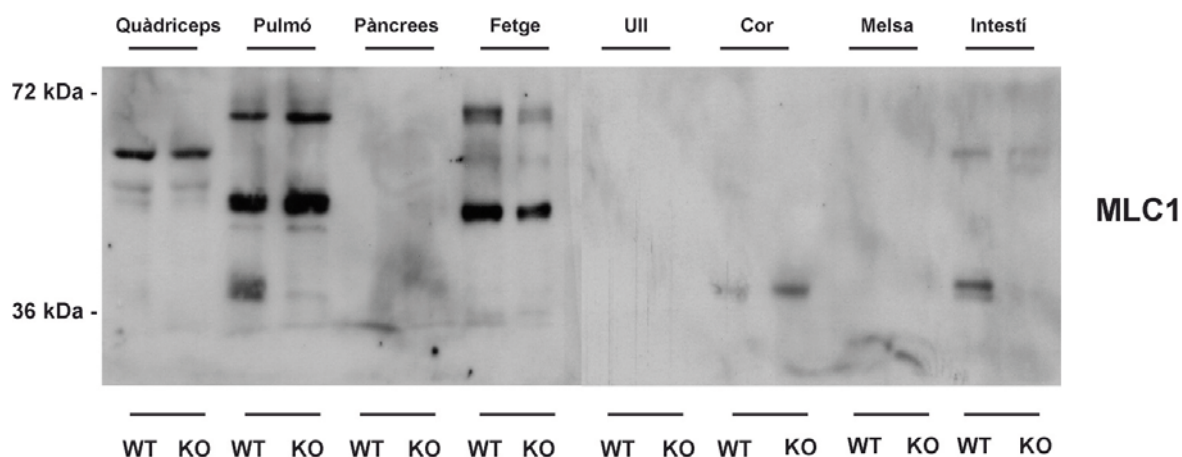


Figura 31. Anàlisi de la proteïna MLC1 en diferents teixits del ratolí *knock-out*. Estudi de l'expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB utilitzant extracte total de proteïna de quàdriceps, pulmó, pàncrees, fetge, ull, cor, melsa i intestí. Es detecta MLC1 utilitzant un anticòs contra la part N-terminal.

L'antiga membre del grup, la Dra. Marisol Montolio, va determinar la presència de la proteïna en diferents teixits de ratolí (Figura 31). Aquests experiments van determinar que la proteïna

MLC1 no s'expressava en cap dels teixits estudiats de la mateixa manera que s'havia observat anteriorment en els teixits de rata. Es van observar, però, algunes bandes en diversos teixits com en el pulmó, fetge, cor o quàdriceps, però no seguien un mateix patró i no corresponien al pes molecular en que es troba la proteïna. Per tant, amb aquests resultats es va corroborar que la proteïna MLC1 només s'expressava en el sistema nerviós.

1.3 ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT DELS ANTICOSSOS GENERATS CONTRA LA PROTEÏNA MLC1

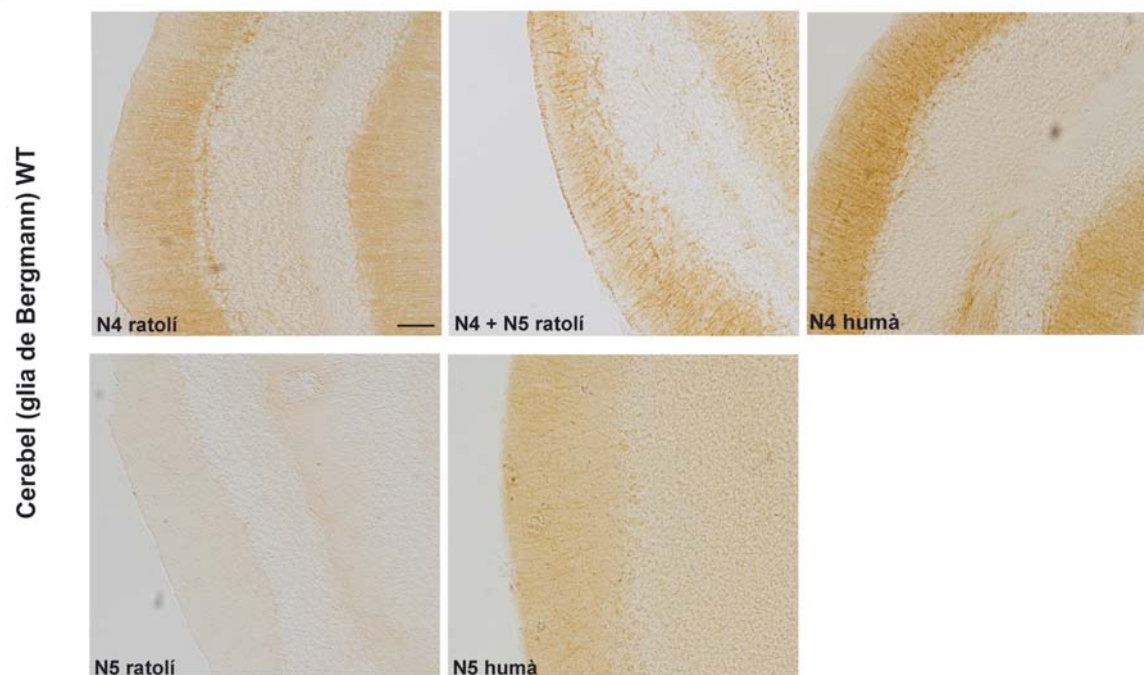
En els darrers anys, el nostre grup de recerca, ha anat desenvolupant diferents tipus d'eines per tal d'estudiar més acuradament la proteïna MLC1 i la leucodistròfia MLC, com els diferents anticossos generats contra aquesta proteïna.

En un primer instant es van generar 4 anticossos contra les parts N-terminal i C-terminal de la proteïna MLC1 de ratolí, que es van utilitzar per a la caracterització de la proteïna al llarg del desenvolupament (Teijido et al., 2004, 2007) però cap d'aquests anticossos detectava la proteïna humana. Per aquesta raó es va decidir generar 3 anticossos més contra la proteïna humana i d'aquesta manera poder disposar de més eines per a l'estudi de la malaltia (Duarri et al., 2008). Els anticossos contra la proteïna humana, en canvi, si que eren capaços de detectar la proteïna de ratolí. D'altra banda, també es va desenvolupar un anticòs contra la proteïna de ratolí però fet en *guinea pig* (conillet d'índies).

A partir de teixit del ratolí *wild-type* i *knock-out* es va realitzar un estudi de la proteïna MLC1 utilitzant aquests anticossos generats en el laboratori per tal de saber si realment aquests anticossos eren del tot específics.

Anteriorment s'havia descrit que en estadis post-natals els nivells més alts d'expressió de la proteïna MLC1 eren en el cerebel, principalment en la capa molecular on es troben situats els processos apicals de la glia de Bergmann, (Teijido et al., 2004, 2007). Per aquest motiu es va decidir realitzar els primers estudis de localització de la proteïna en la regió del cerebel.

A)



B)

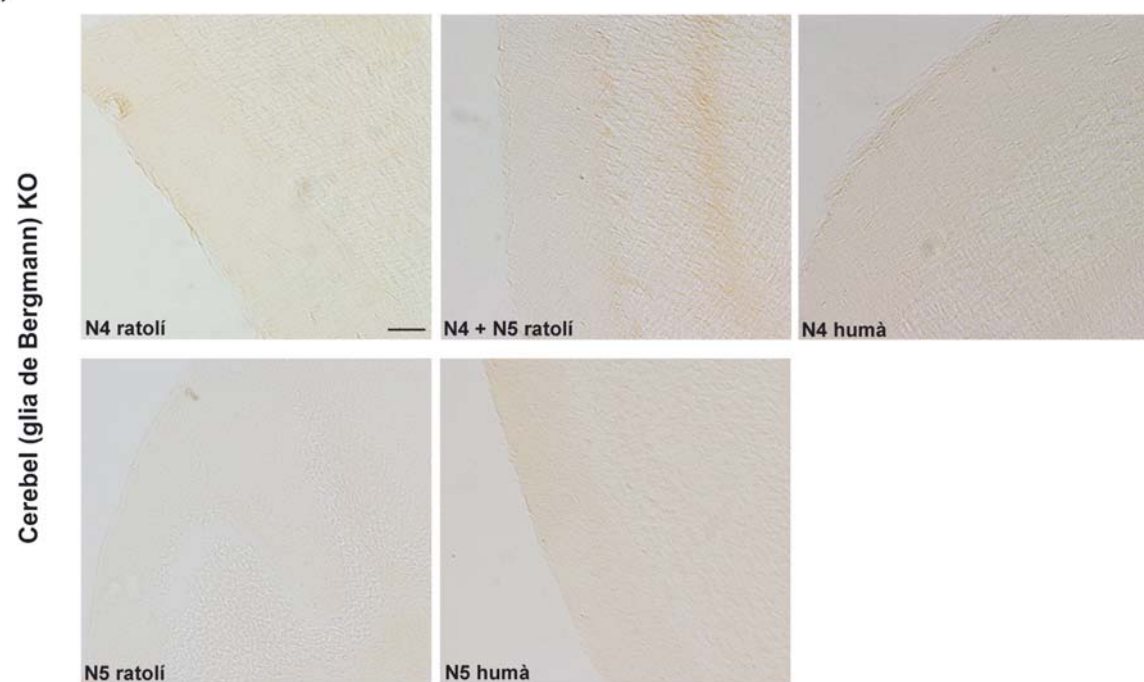


Figura 32. Estudi de la de la proteïna MLC1 en la glia de Bergmann a partir dels diferents anticossos generats al laboratori. A) Estudi de la localització de la proteïna MLC1 mitjançant immunohistoquímica per DAB en cerebel de ratolí WT utilitzant els anticossos següents: N4 contra la proteïna ratolí, N4+N5 contra la proteïna de ratolí, N4 contra la proteïna humana, N5 contra la proteïna de ratolí i N5 contra la proteïna humana B) Estudi de la localització de la proteïna MLC1 mitjançant immunohistoquímica per DAB en cerebel de ratolí KO utilitzant els anticossos següents: N4 contra la proteïna ratolí, N4+N5 contra la proteïna de ratolí, N4 contra la proteïna humana, N5 contra la proteïna de ratolí i N5 contra la proteïna humana. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra : 200 μ m.

Els anticossos utilitzats per aquests estudis van ser els següents: N4 contra la proteïna de ratolí, N4+N5 contra la proteïna de ratolí, N5 contra la proteïna de ratolí, N4 contra la proteïna humana i N5 contra la proteïna humana. Els anticossos van donar positius per a la localització de la proteïna MLC1 en la glia de Bergmann en els animals *wild-type* (Figura 32 A). No obstant, l'anticòs N5 de ratolí, a diferència dels altres, donava una marca més suau de la proteïna molts cops gairebé indetectable. En el cas dels animals *knock-out*, tots els anticossos van donar negatius en aquesta regió (Figura 32 B). Aquests resultats indicaven que la majoria dels anticossos eren específics per la proteïna en aquesta regió.

Aquests resultats també van mostrar que amb uns anticossos la proteïna es detectava de manera més clara essent per tant aquests anticossos més específics. Per exemple l'anticòs N4+N5 contra la proteïna de ratolí, el qual es una barreja de dos pèptids, l'anticòs N4 contra la proteïna de ratolí i el N4 contra la proteïna humana eren els que mostraven una marca més definida en els processos apicals de la glia de Bergmann.

Paral·lelament també es van realitzar estudis d'immunohistoquímica per DAB per tal de poder detectar la proteïna en els astròcits localitzats al voltant dels vasos sanguinis tal i com s'havia descrit anteriorment (Teijido et al., 2004).

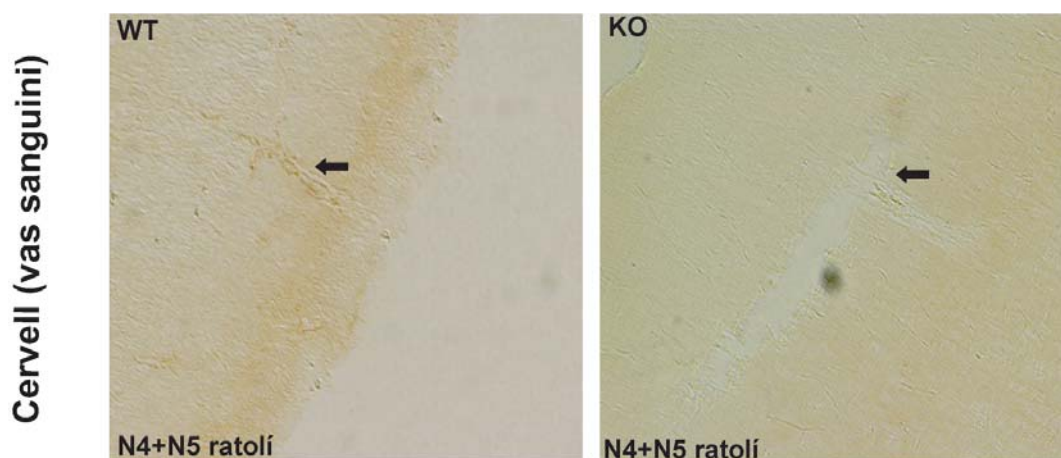


Figura 33. Estudi de la proteïna MLC1 als peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. Estudi de la localització de la proteïna MLC1 al voltant dels vasos sanguinis (fletxes), mitjançant immunohistoquímica per DAB utilitzant l'anticòs N4+N5 contra la proteïna de ratolí. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra : 200 μ m.

Mitjançant aquesta tècnica només es van poder obtenir imatges que mostraven una bona senyal de la proteïna al voltant dels vasos amb l'anticòs N4+N5 contra la proteïna de ratolí (Figura 33, fletxes). Les imatges obtingudes amb els altres anticossos mostraven un marcatge de la proteïna més difús segurament per algun defecte de la tècnica i pel fet que la proteïna no fos tan abundant en aquesta regió com en el cerebel (imatges no mostrades).

Anteriorment, també s'havia descrit que MLC1 es trobava localitzada en neurones (Teijido et al., 2004, 2007). La possible localització neuronal de MLC1 havia generat controvèrsies entre els diferents grups que estudien la malaltia (Boor et al., 2005; Schmitt et al., 2003). Durant la realització de l'estudi de la localització de la proteïna MLC1 en el model de ratolí, es va observar que el cervell de l'animal *knock-out* presentava marca positiva en els feixos d'axons a diferents regions, com són l'hipocamp i el bulb olfactiu (Figura 34, fletxes). Aquests resultats estaven indicant que la marca que s'havia observat i descrit anteriorment en les neurones no era específica i que, per tant, la proteïna MLC1 no es troba present en les neurones.

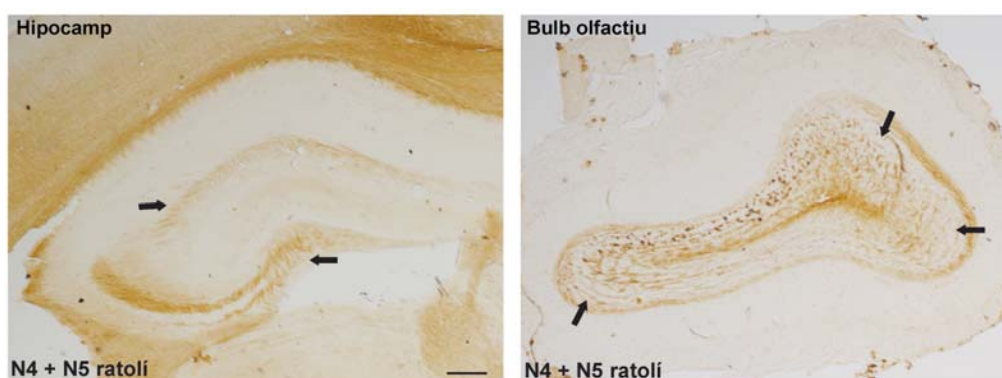


Figura 34. Estudi de la proteïna de MLC1 en les neurones. Localització de MLC1 en tractes axonals (fletxes) en l'hipocamp i en el bulb olfactiu del ratolí *knock-out* essent aquesta per tant una marca inespecífica. Barra: 200 μm .

A banda de l'estudi de la localització de la proteïna també es van realitzar estudis de detecció en extractes de membrana provinents d'animals *wild-type* i *knock-out* mitjançant WB. Els resultats van determinar que tots els anticossos utilitzats per a la realització de l'experiment mostraven una senyal relativament alta en els teixits del *wild-type* i en el pes molecular corresponent al dímer i al monòmer. En el cas de l'anticòs N4+N5 fet en *guinea pig*, el WB mostrava una doble banda en el monòmer a 36kDa indicant que l'anticòs no era del tot específic per la proteïna mitjançant aquesta tècnica. La utilització de l'anticòs contra un pèptid de la part C-terminal de la proteïna, mostrava l'absència de la proteïna en el dímer a 72 kDa (Figura 35). Aquest resultat era important ja que per a la generació de l'animal *knock-out* no s'havia eliminat la part C-terminal de la proteïna i, per tant, aquestes dades corroboraven la manca de MLC1.

En base als resultats descrits anteriorment, els anticossos escollits per a la realització dels diferents experiments d'aquest treball van ser, el N4 contra la proteïna de ratolí, el N4+N5 contra la proteïna de ratolí i el N4 contra la proteïna humana.

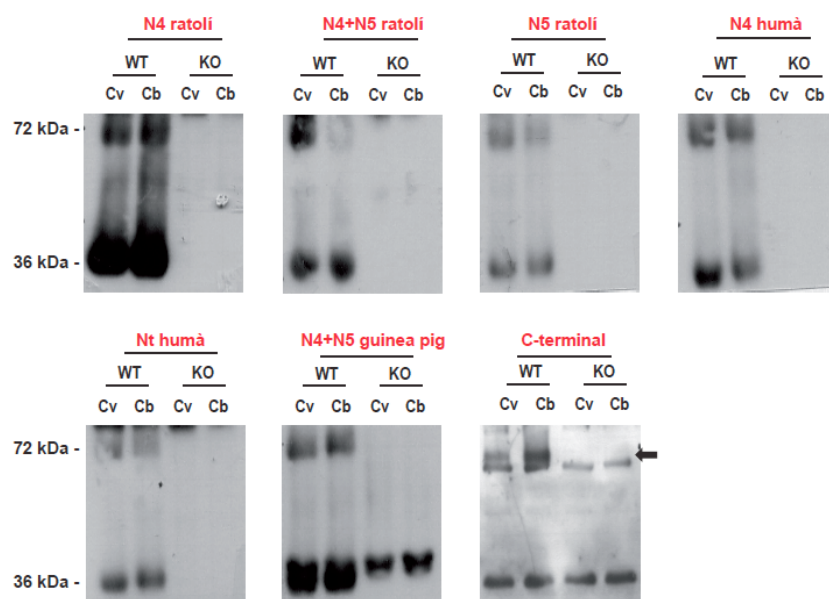


Figura 35. Anàlisi de la proteïna MLC1 en el ratolí *knock-out* a partir dels diferents anticossos generats al laboratori. Estudi de l'expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB utilitzant extractes de proteïna total de cervell i de cerebel d'animals *wild-type* i *knock-out* utilitzant els anticossos següents: N4 contra la proteïna de ratolí, N4+N5 contra la proteïna de ratolí, N5 contra la proteïna de ratolí, N4 contra la proteïna humana, Nt contra la proteïna humana, N4+N5 contra la proteïna de ratolí fet en *guinea pig* i C-terminal contra la proteïna de ratolí (fletxa: banda específica per a la proteïna amb l'anticòs C-terminal). Cv:cervell; Cb:cerebel.

Una vegada verificat que el model *knock-out* per *Mlc1* era deficient per la proteïna i que era un model viable per a l'estudi de la malaltia, es va realitzar la caracterització del fenotip dels animals.

2. CARACTERITZACIÓ DE L'ANIMAL *KNOCK-OUT* DE *Mlc1*

2.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1

Després de comprovar que l'animal no expressava la proteïna i que els anticossos dels quals es disposava eren específics, es van analitzar més detingudament els teixits dels ratolís *knock-out* i *wild-type*, duent a terme estudis de localització per immunofluorescència utilitzant l'anticòs N4 contra la proteïna de ratolí. Per tal d'assegurar-nos que la proteïna MLC1 no es trobava present en els astròcits es van fer dobles marcatges amb GFAP, ja que aquesta és una proteïna típica d'aquest tipus cel·lular.

Donada la bona detecció de la proteïna MLC1 en la glia de Bergmann del ratolí, els estudis de localització es van centrar en aquesta regió i al voltant dels vasos sanguinis en diferents regions del cervell.

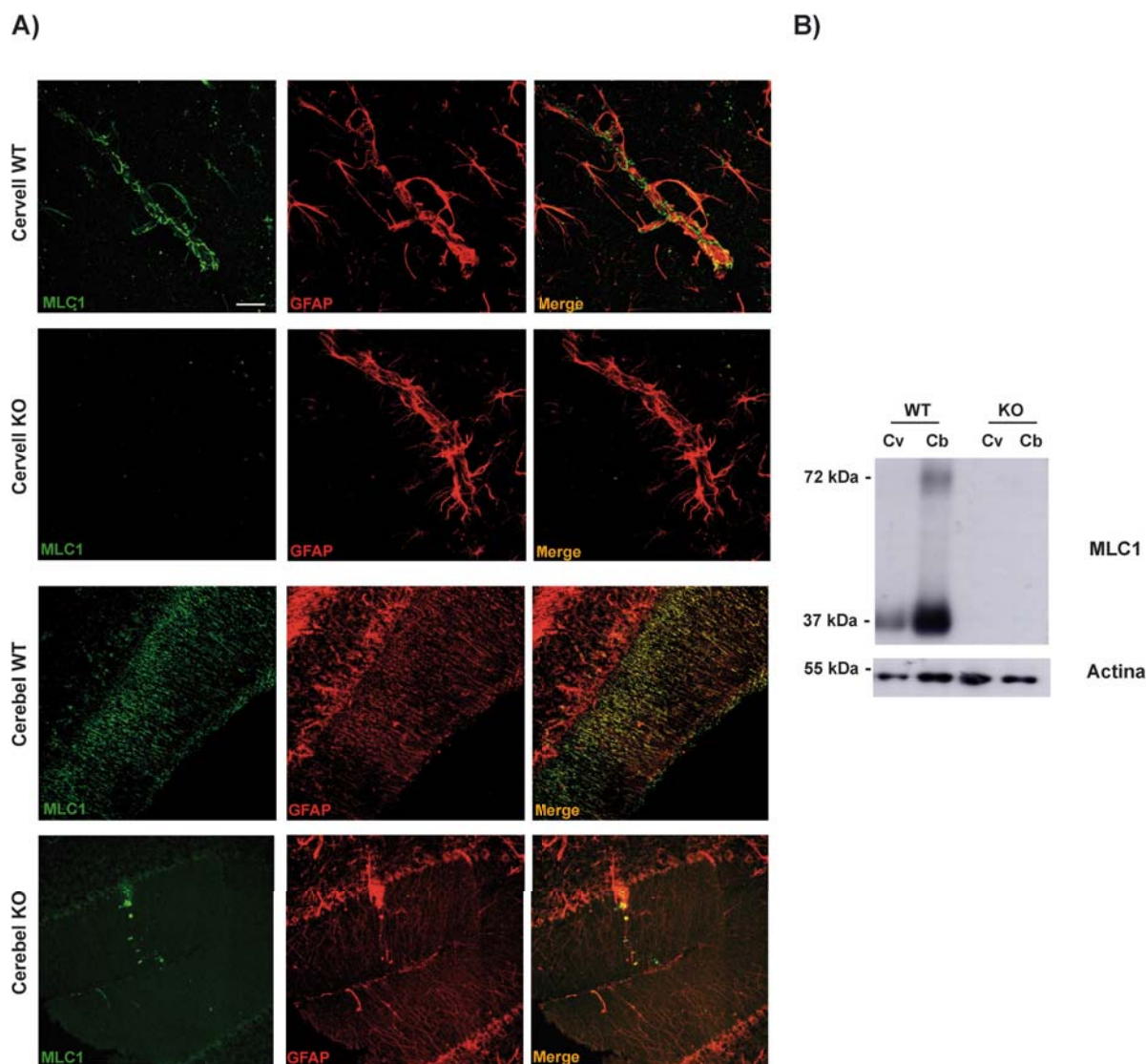


Figura 36. Anàlisi de la proteïna MLC1 en el teixit del ratolí *knock-out*. A) Estudi de la localització de la proteïna MLC1 a partir d'immunofluorescències de doble marcatge amb GFAP realitzades en el cervell i el cerebel del ratolí *knock-out* i del ratolí *wild-type*. B) Estudi de l'expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB a partir d'extractes de membrana de cervell i de cerebel dels animals *knock-out* i *wild-type*. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal i GFAP amb un anticòs comercial. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Cv:cervell; Cb:cerebel; WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

Els nous resultats, d'acord amb els resultats obtinguts anteriorment en teixit de rata i de ratolí, mostraven una clara colocalització de les dues proteïnes en el cervell i en el cerebel control (*wild-type*). En el cervell *wild-type* la proteïna MLC1 es trobava localitzada en els astròcits perivasculars, situats al voltant del vasos sanguinis. En el cas del cervell del *knock-out* s'observava la total absència de la proteïna. Paral·lelament també es van fer immunofluorescències en el cerebel dels animals *wild-type* i *knock-out*. En aquest cas també es va apreciar la manca de la proteïna MLC1 en la glia de Bergmann en el teixit del *knock-*

out respecte el *wild-type*, el qual mostrava una clara marca de la proteïna en els processos apicals d'aquesta regió del cerebel (Figura 36 A).

Es va analitzar de nou la presència de la proteïna MLC1 mitjançant WB, aquest cop a partir d'extractes de membrana. La proteïna MLC1 és trobava absent tant en el cervell com en el cerebel del ratolí *knock-out*. Amb l'extracte del teixit *wild-type* s'apreciava una marca clara de la proteïna en el seu correcte pes molecular i en major quantitat en el cerebel respecte el cervell (Figura 36 B).

2.2 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT A PARTIR DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA D'IMATGE (MRI)

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica és una malaltia que es diagnostica seguint uns criteris clínics i a partir de neuroimatges obtingudes mitjançant estudis de ressonància magnètica d'imatge (MRI).

Els criteris de MRI per constatar que un pacient presenta MLC són : 1) mostrar macrocefàlia; 2) mostrar una senyal difusa i una certa inflamació en la substància blanca; 3) preservació de regions com són el cos callós, la càpsula interna i el bulb raquidi; 4) absència d'anormalitats en la regió de la substància gris; i 5) presència de quists subcorticals a les regions anterior-temporal i en alguns casos a la regió fronto-parietal (van der Knaap et al., 1995a, 2012).

Seguint aquests criteris, es va decidir analitzar els animals *knock-out* a partir de MRI de la mateixa manera que es fa amb els pacients. Aquests anàlisis es van realitzar amb col·laboració amb la Dra. Guadalupe Soria (IDIBAPS).

Actualment la tècnica de MRI és una eina molt valuosa per a l'estudi i el diagnòstic de malalties neurològiques ja que es una tècnica no invasiva. Els equips de MRI són aparells de gran precisió que obtenen informació sobre la distribució dels àtoms en el cos. L'element principal de l'equip és un iman que genera un camp magnètic constant de gran intensitat. Es produeix un alineament dels protons amb el camp magnètic de l'iman i posteriorment l'equip emet polsos de radiofreqüència per tal de canviar el camp magnètic dels protons al transmetre energia. Quan els polsos de radiofreqüència cessen, la magnetització torna als seu estat normal i s'allibera energia. Aquesta alliberació d'energia es mesura en **temps de relaxació T1** (relaxació longitudinal) i **T2** (relaxació transversal). Les imatges obtingudes amb les mesures de T1 indiquen que estructures amb un temps de relaxació curt, com per exemple la grassa corporal, apareix amb una alta intensitat de senyal. En canvi, l'aigua o estructures riques en aigua, com per exemple el líquid cefaloraquídi, apareixen amb una

baixa intensitat. Les imatges obtingudes amb les mesures de T2 indiquen que estructures amb un temps de relaxació més llarg, com per exemple l'aigua, apareixen amb una alta intensitat de senyal a diferència de les estructures amb temps de relaxació més curt. La utilitat bàsica de les imatges potenciades amb T1 i T2 està en què aquestes proporcionen una detallada i excel·lent anatomia ajudant a la detecció de possibles entitats patològiques.

En un primer intent de l'estudi del fenotip mitjançant MRI, és van analitzar animals que tenien entre 5 i 6 mesos d'edat. En el cas de la MLC es requeria de les imatges potenciades en T2, ja que es volia saber si els animals *knock-out* estaven acumulant aigua en les seves cavitats. Els primers resultats obtinguts no mostraven cap diferència d'intensitat en les imatges T2 entre l'animal *knock-out* i el *wild-type*, indicant que no hi havia acumulació d'aigua. Aquests primers resultats van fer pensar que possiblement, a diferència del que passa en humans, el ratolí presentaria un fenotip més tardà tal i com passa amb altres models animals de leucoencefalopaties; per exemple en el model de l'Adrenoleucodistrofia (Pujol, 2002).

Posteriorment, es van analitzar dos animals *knock-out* de 18 mesos d'edat i un animal *wild-type* de la mateixa edat. En aquest cas, les imatges obtingudes mostraven que els animals *knock-out* sí que presentaven hiperintensitats en la substància blanca del cerebel essent aquesta més difusa. En canvi, l'animal *wild-type* no mostrava cap tipus de dany (dades no mostrades). El fet que els animals mostressin un fenotip tan tardà podria dificultar molt els estudis posteriors, ja que es necessitaria que els animals fossin vells per a poder caracteritzar degudament el model. Per aquesta raó, es van seleccionar animals d'altres edats per analitzar a partir de MRI i saber si el fenotip es podia observar en els animals més joves.

Per a realitzar aquest tercer experiment es van escollir animals d'ambdós genotips a les edats compreses entre 7-8 mesos i 12-13 mesos. Els resultats obtinguts a partir de les imatges de MRI van ser molt positius ja que es va observar un fenotip característic a les diferents edats seleccionades similar al que s'observa en els pacients que pateixen la fisiopatologia MLC (Figura 37).

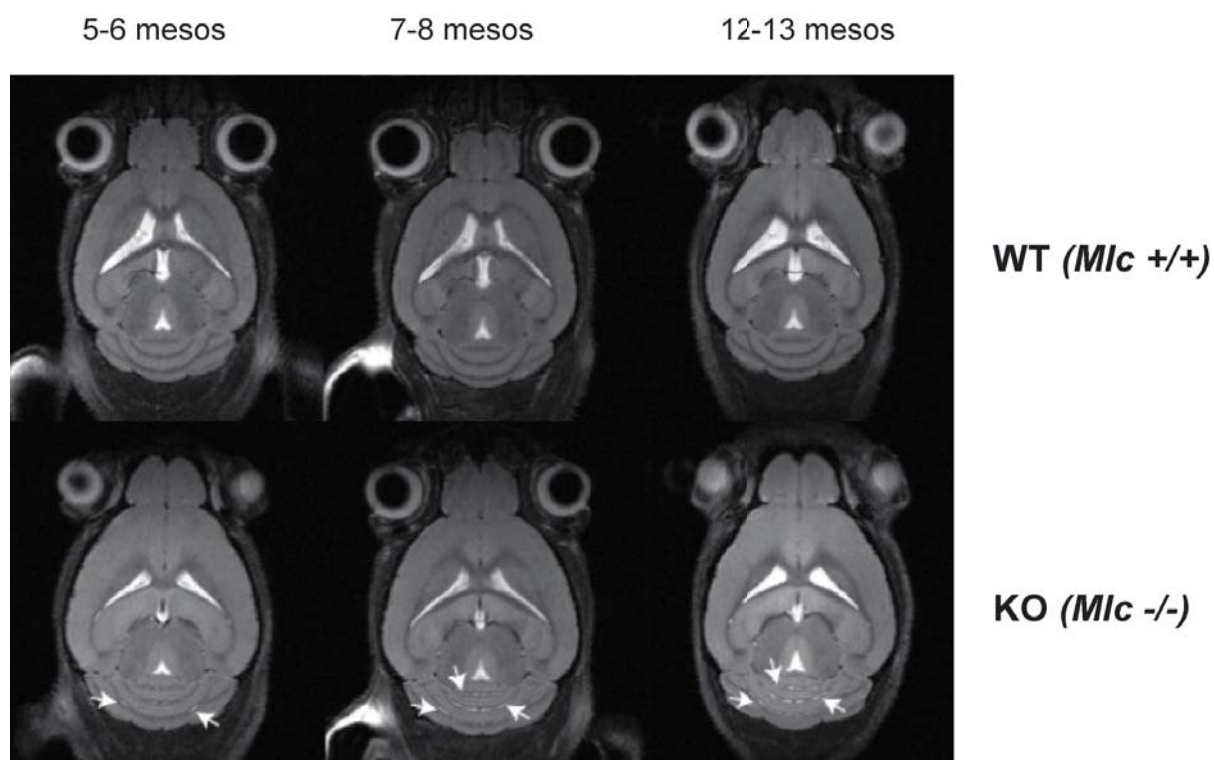


Figura 37. Presència del fenotip vacuolitzant observat mitjançant imatges de MRI en animals *knock-out* a diferents edats. Estudi de les imatges de MRI en T2 realitzades en animals WT i KO a diferents edats. S'observen hiperintensitat en el cerebel indicant que la substància blanca es troba difusa (fletxes). WT: *wild-type*, *Mlc1*^{+/+}; KO: *knock-out*, *Mlc1*^{-/-}.

Les imatges T2 van mostrar una major intensitat en el cerebel dels animals *knock-out*, tant a 7-8 com a 12-13 mesos. Concretament es va observar una substància blanca difusa (Figura 37, fletxes), de la mateixa manera que s'observa en els pacients que pateixen MLC. Aquesta senyal de difusió implicava que hi havia una acumulació d'aigua en la substància blanca d'aquesta regió. D'altra banda, els animals *wild-type* no mostraven cap tipus d'intensitat indicant que les seves cavitats es mantenien intactes i que, per tant, el que s'estava observant en els animals *knock-out* era específic de la malaltia. En canvi, a diferència del que passa en humans, els animals *knock-out* estudiats no presentaven quists.

Quan es va observar el fenotip vacuolitzant en aquestes edats, es va pensar en reexaminar i analitzar de manera acurada les imatges obtingudes anteriorment amb els animals de 5-6 mesos. Es va poder comprovar que aquests animals més joves ja començaven a tenir la substància blanca del cerebel una mica difusa (Figura 37, fletxes), indicant que el fenotip apareixia en edats més primerenques.

Els resultats obtinguts a partir de les imatges de MRI en els animals a diferents edats, indicaven que el fenotip vacuolitzant observat en el cerebel s'anava incrementant amb el

temps ja que els animals de 12-13 mesos presentaven un major grau d'intensitat en la substància blanca del cerebel respecte els animals de 7-8 mesos i els de 5-6 mesos.

Aquests animals però, no desenvolupaven macrocefàlia aparent no mostraven presència de quists. Així doncs, després d'observar, a partir de les imatges de MRI, que realment hi podia haver una acumulació d'aigua, va sorgir la pregunta de si podria existir algun tipus de diferència en el volum del cervell entre els animals *wild-type* i els animals *knock-out*.

Es van analitzar les imatges obtingudes de l'anàlisi per MRI i es va quantificar el volum del cervell de cada animal *wild-type* i de cada animal *knock-out*. Cada imatge de MRI està formada per una seqüència d'imatges (40 *stacks*). A partir de cada imatge individual de cada animal, es van obtenir dades de diferents ROIs (regions d'interès) seleccionades, incloent cervell i cerebel. Cada àrea es va convertir a unitat de volum (mm^3) i es va fer el càlcul del volum total de cada animal.

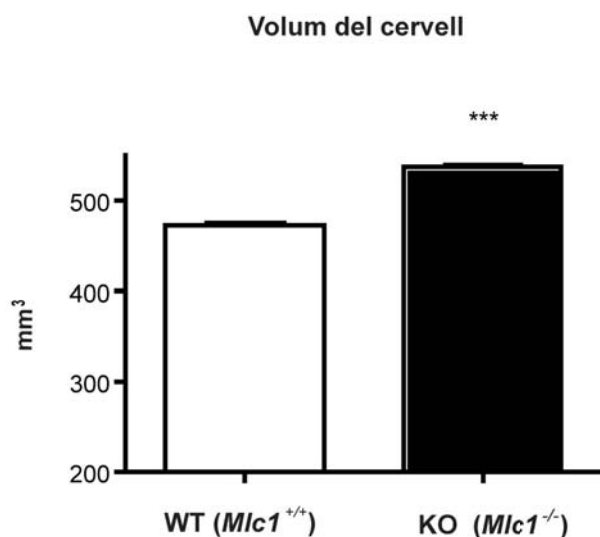


Figura 38. Volum del cervell dels animals *knock-out* analitzats per MRI. Quantificació del volum mitjançant les imatges T2. Unitats de volum: mm^3 . Nombre d'animals utilitzats per a l'experiment: WT (*wild-type*)=7; n; KO (*knock-out*)=7. Estadística: *** $p < 0,0001$ *t*-Student no aparellada.

Els càlculs de volum realitzats en els animals d'ambdós genotips van demostrar que els animals *knock-out* presentaven un volum significativament major en el cervell respecte els animals *wild-type*, indicant que aquests animals estaven acumulant aigua en les seves cavitats (Figura 38).

Per tant aquests resultats indicaven que tot i no poder observar macrocefàlia en els animals *knock-out*, aquests sí que presentaven aquesta característica fenotípica similar al que mostraven els pacients amb MLC.

2.3 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT MITJANÇANT ESTUDIS DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Anteriorment, mitjançant estudis de microscòpia electrònica realitzada en la biòpsia d'un pacient, s'havia demostrat que el fet de tenir la proteïna MLC1 mutada originava vacuoles a les capes més externes de la mielina (van der Knaap et al., 1996).

Anys després, reexaminant la biòpsia del mateix pacient és va observar que la presència de vacuoles no era únicament en la substància blanca sinó que també es trobaven vacuoles als astròcits. A part, s'havien generat models astrocitaris *knock-down* per RNA d'interferència de les proteïnes MLC1 i GlialCAM, i en tots dos casos, els astròcits amb expressió disminuïda de les proteïnes presentaven un gran nombre de vacuoles (Capdevila-Nortes et al., 2013; Duarri et al., 2011).

En col·laboració amb el grup del Dr. Isidre Ferrer (UB-IDIBELL) es van realitzar estudis de microscòpia electrònica a les edats de 10 i 18 mesos per tal de comprovar si el model *knock-out* generat també presentava vacuoles a la mielina i als astròcits.

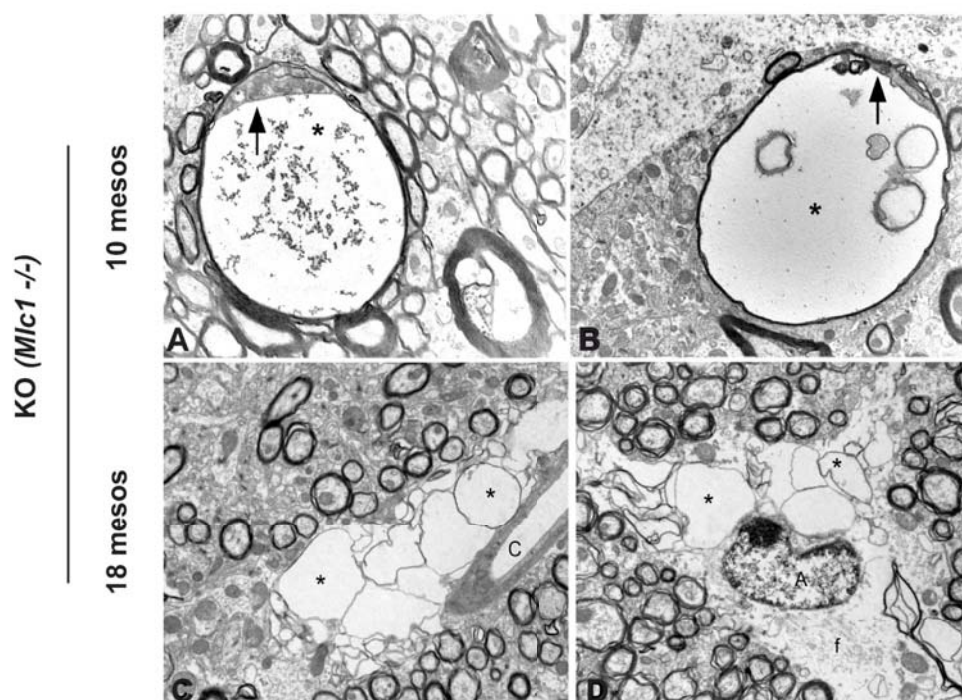


Figura 39. Presència del fenotip vacuolitzant observat mitjançant microscòpia electrònica en el ratolí *knock-out*. A i B) Imatges de teixit de l'animal KO a 10 mesos d'edat on s'observa la presència de vacuoles (asteriscs) a les capes més externes de la mielina. C i D) Imatges de teixit de l'animal KO a 18 mesos d'edat on s'observa presència de vacuoles (asteriscs) al voltant de capil·lars, dels astròcits i a la substància blanca del cervell. KO: *knock-out*, *Mlc1*^{-/-}. O: oligodendròcit; A: astròcit; C: capil·lars. Barra: 2 μm.

Es va analitzar el cerebel dels animals i es va observar que en el teixit del *wild-type* les estructures cel·lulars i l'organització estaven intactes (dades no mostrades). En el teixit de l'animal *knock-out* de 10 mesos d'edat es podia observar la presència de vacuoles a les capes més externes de la mielina dels axons del cerebel (asteriscs) (Figura 39 A i B). Les imatges C i D de la figura 39, de teixit de l'animal *knock-out* a 18 mesos d'edat mostraven la formació de vacuoles (asteriscs), principalment localitzades en la substància blanca del cerebel i en aquest cas, també s'observaven vacuoles en els astròcits que es trobaven rodejant els capil·lars.

Així doncs, es va determinar que el ratolí *knock-out* presentava un fenotip vacuolitzant similar al que s'havia observat en els pacients i el que mostraven els models cel·lulars astrocitaris *knock-down*.

Paral·lelament als estudis de microscòpia electrònica també es van dur a terme tincions d'hematoxilina i eosina en teixits de l'animal *wild-type* i del *knock-out* a 10 mesos d'edat. Les imatges de les tincions mostraven la presència d'una gran quantitat de vacuoles, principalment en la regió de la substància blanca localitzada entre les capes granulars del cerebel del ratolí *knock-out*, com havien indicat les imatges de MRI. El teixit corresponent a l'animal *wild-type* mostrava intacta aquesta mateixa regió, indicant que les vacuoles eren específiques de la deficiència de la proteïna MLC1 (Figura 40).

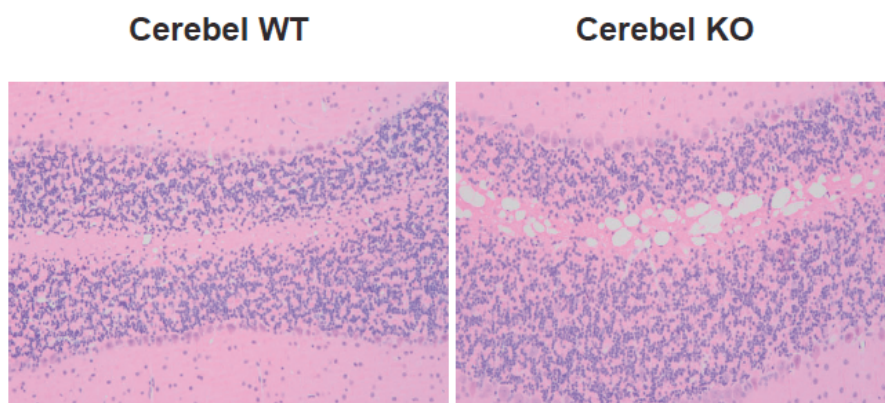


Figura 40. Presència del fenotip vacuolitzant observat mitjançant histologia. Estudi de la integritat de la substància blanca mitjançant la realització de tincions d'hematoxilina i eosina en el cerebel d'animals. En el teixit de l'animal KO s'observa una gran quantitat de vacuoles en la capa granular del cerebel. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*.

2.4 ESTUDIS DE COMPORTAMENT I DE NEUROFISIOLOGIA EN EL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

La gran majoria de persones afectades per la MLC presenten deteriorament de les funcions motores a diferents graus. Ja que alguns pacients també presenten deteriorament dels potencials evocats visuals amb el temps (van der Knaap et al., 2012), es va procedir a estudiar si aquests animals deficients en la proteïna MLC1 mostraven algun tipus de dificultat en les seves funcions motores i si presentaven algun tipus de deteriorament en els seus nervis.

En aquest apartat s'introdueixen les bases de les tècniques per a poder entendre millor els anàlisis que s'han fet i perquè s'han dut a terme per personal extern al nostre laboratori.

2.4.1 Test Rotarod

Els estudis de comportament es van realitzar amb la col·laboració de la Dra. Mara Dierssen (CRG).

Existeixen diferents tipus de tests de comportament per a l'estudi en models animals de malalties. En el cas de les malalties neurològiques els tests estan enfocats principalment a l'estudi de les funcions motores. Entre aquests diferents tests el Rotarod és el més utilitzat i adequat per a l'estudi de dèficits en el cerebel de rosegadors (Caston et al., 1995; Lalonde et al., 1995). Aquest test és una prova de rendiment que es basa principalment en l'avaluació de l'equilibri i la coordinació sensoriomotriu dels subjectes a partir de la rotació d'una vareta amb l'activitat de la força motriu (Shiotsuki et al., 2010).

Es va seleccionar un grup d'animals mascles *knock-out* i *wild-type* de 18 mesos d'edat, i se'ls va realitzar el test Rotarod per intentar esbrinar si aquests animals presentaven algun tipus de dificultat en els seus moviments a causa de la deficiència de MLC1.

Primerament se'ls va sotmetre un exercici amb una velocitat fixa (4 r.p.m.) per saber si els animals *knock-out* mostraven una major dificultat d'aprenentatge (Figura 41 A). Tal com s'observa en el gràfic, no hi havia diferències entre els animals *wild-type* i els *knock-out*, per tant aquests resultats indicaven que els dos grups eren capaços d'aprendre la tasca correctament.

Després se'ls va aplicar un entrenament a diferents velocitats (4,9,14,19,24 i 34 r.p.m.) i es va mesurar el temps de latència de caigudes. En aquest cas hi havia certes diferències, tot i que no eren no significatives, entre els animals *wild-type* i *knock-out*. Els ratolins *wild-type* aguantaven més temps a sobre de la vareta a les diferents velocitats aplicades respecte els

animals *knock-out*, els quals queien més ràpidament en la gran majoria de les velocitats. A les velocitats majors tots els animals queien al poc temps de començar la tasca (Figura 41 B).

Finalment se'ls va realitzar un estudi en que hi havia una acceleració constant de 4 a 40 r.p.m. (Figura 41 C). En aquest cas no es van observar diferències entre els dos grups d'animals. Ni els animals *wild-type* ni els animals *knock-out* van ser capaços de realitzar aquesta tasca correctament, ja que tal i com s'observa en el gràfic, els animals només eren capaços d'arribar la velocitat de 14 r.p.m. Aquests resultats van suggerir que la tasca d'acceleració no era adequada en aquest cas.

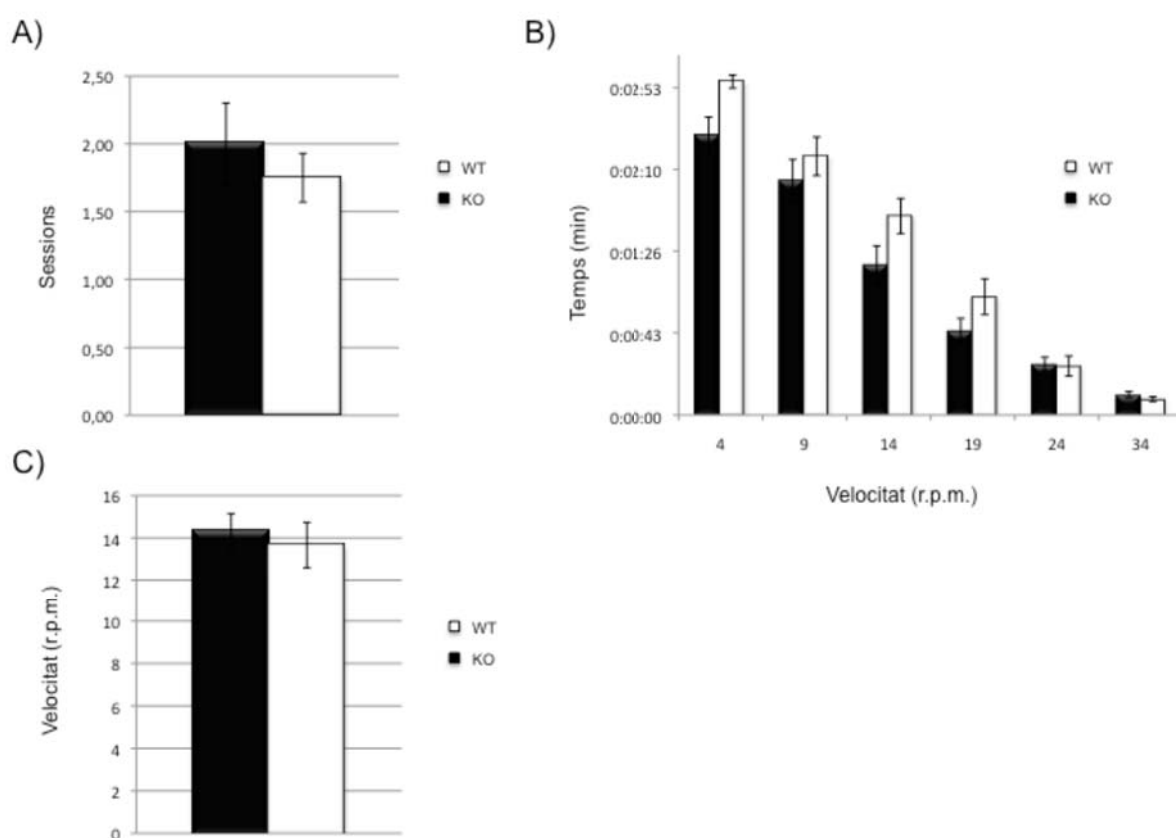


Figura 41. Estudi de comportament del ratolí *knock-out* mitjançant el test Rotarod. A) Estudi d'aprenentatge dels ratolins. B) Estudi del temps de latència de caigudes a diferents velocitats. C) Entrenament amb acceleració. Els animals utilitzats van ser n=9 els WT i n=12 els KO. Els animals tenien entre 19 i 17 mesos d'edat. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Estadística: ns, *t*-Student no aparellada.

Els resultats obtinguts amb les diferents tasques realitzades mitjançant el test Rotarod mostraven que els animals *knock-out* no presentaven cap tipus de disfunció motora.

2.4.2 Electroretinogrames i *Auditory Brain Response (ABR)*

A banda de les funcions motores, es van analitzar els nervis visuals i auditius, a partir de potencials evocats. Aquests estudis es van realitzar amb la col·laboració del Dr. Pedro de la Villa (Universitat d'Alcalà) i amb la Dra. Sílvia Murillo i la Dra. Isabel Varela (S.E.A del I.I.B "Alberto Sols" CSIC-UAM).

Els potencials evocats són uns mètodes d'exploració neurofisiològica que consisteixen en la recepció i identificació de senyals bioelèctriques que es generen en el SNC o SNP, a partir de l'estimulació amb estímuls específics de nervis perifèrics, òrgans sensorials, estructures centrals motores i d'àrees corticals cognitives. Aquestes senyals bioelèctriques registrades estan constituïdes per una seqüència d'ones de mida més petita, en el rang de μV (microvolts).

L'ull és un òrgan d'una gran complexitat. Aquest es divideix en tres compartiments : 1) *Capa externa* formada per la còrnia i per darrera l'escleròtica; 2) *Capa mitja* que també s'anomena úvea i esta formada per la coroides, el cos ciliar i l'iris; i 3) *Capa interna*, és la part fotosensible de l'ull i esta formada per la retina. La **retina** consta de deu capes diferents de les quals tres consisteixen en cossos neuronals separats per dos capes de sinapsis. S'han descrit fins a 55 tipus cel·lulars diferents (Masland, 2001), els quals estan dividits en sis grups fonamentals: fotoreceptors, cèl·lules bipolars, cèl·lules horitzontals, cèl·lules amacrines, cèl·lules interplexiformes i cèl·lules ganglionars. Es coneixen dos tipus de fotoreceptors: els *cons*, els quals s'encarreguen de la visió diürna, i els *bastons*, els quals s'encarreguen de la visió nocturna.

La tècnica que s'utilitza principalment per a l'estudi de la funció de la retina són els electroretinogrames (ERG). Aquesta tècnica és basa en la resposta massiva de la retina a l'estimulació de la llum (Pinto and Enroth-Cugell, 2000; Ridder and Nusinowitz, 2006). La resposta que recull el ERG és produïda pel moviment d'ions entre les diferents cèl·lules de la retina. El moviment iònic es deu fonamentalment al transit K^+ i el Na^+ , a través de l'obertura i el tancament de canals. Aquesta activitat es mesurada per un elèctrode de registre col·locat a sobre de la superfície de la còrnia (Sobrin et al., 2005). Aquesta és una tècnica de caràcter no invasiu.

A partir dels registres dels ERG realitzats en animals de la colònia *knock-out* es van generar cinc respostes d'anàlisi obtingudes en base al tipus d'estímul i condicions lumíniques. Per a cada registre es va mesurar l'amplitud màxima de cada ona i el temps que transcorre des de l'aplicació de l'estímul lluminós fins al pic màxim de cada ona analitzada. Aquesta mesura

rep el nom de **temps implícit** (Marmor et al., 2009). La figura 42 mostra les cinc respostes obtingudes, les quals van ser:

1. Sensibilitat de bastons: s'obté a partir del registre de l'activitat elèctrica de la retina en condicions d'adaptació a la foscor. Es un tipus d'ona que es genera en els bastons.
2. Resposta mixta de cons i bastons: Es la traça que es registra davant d'un *flash* de llum blanca, de gran intensitat i de curta durada, que és capaç d'activar completament tant els cons com els bastons. Aquesta resposta la conformen una desviació de llum negativa (ona a) seguida d'una desviació positiva (ona b).
3. Potencials oscil·latoris: són una sèrie de desviacions de la llum, tant positives com negatives, de curs temporal ràpid a partir d'un estímul potent.
4. Resposta dels cons: aquesta és la resposta d'adaptació de la retina a una gran quantitat de llum de manera que la contribució dels bastons es queda anul·lada. S'anomena ona b_{fot} .
5. Resposta *flicker*: és una estimulació repetida amb *flashos* de llum blanca de curta durada i de gran intensitat aplicats en condicions de gran quantitat de llum. Es registra l'activació dels cons.

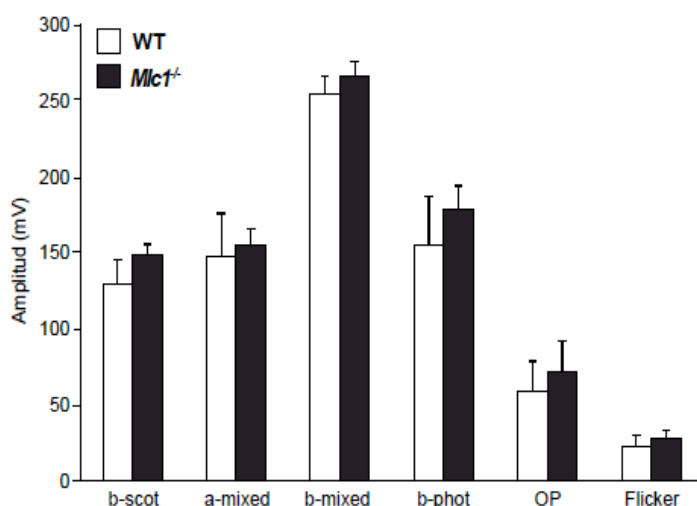


Figura 42. Representació gràfica dels ERG realitzats en els animals *knock-out*. Es mostren les diferents respostes obtingudes a partir dels ERG en animals WT i en animals KO. Animals utilitzats per a l'experiment: n WT= 7; n KO= 7. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Estadística: ns, *t*-Student no aparellada.

Els resultats dels ERG van demostrar que no hi havia cap diferència en els diferents tipus de respostes analitzades entre els animals *wild-type* i els animals *knock-out* (Figura 42). Es podia concloure que els animals deficients amb MLC1 no semblaven presentar cap dany en el seus nervis visuals.

Aquests resultats no coincideixien amb el que s'havia observat en humans, ja que els pacients amb MLC presenten un deteriorament al llarg del temps en els seus potencials evocats visuals (van der Knaap et al., 1995b, 2012).

A banda de l'estudi de la retina, es van realitzar estudis dels nervis auditius a partir d'anàlisis ABR (*Auditory Brain Response*).

El sistema auditiu està format per la regió perifèrica o oïda, en la qual els estímuls sonors conserven el seu caràcter original d'ones mecàniques fins al moment de conversió en senyals electroquímiques. En la regió central és on aquestes senyals es transformen en sensacions. L'oïda es divideix en tres zones: 1) *Oïda externa*: aquesta zona està formada principalment per l'orella i el timpà i la seva principal funció és la de recollir les ones sonores i transportar-les a l'oïda mitja a partir del conducte auditiu. 2) *Oïda mitja*: formada per tres ossets principals, martell, enclusa i estrep, units entre si de forma articulada. També s'hi troba la trompa d'Estaqui i les cel·les neumàtiques. Les tres funcions principals de l'oïda mitja són la transmissió d'ones sonores des de l'oïda externa fins a l'interna, l'adaptació d'impedància entre el medi aeri (extern) i el medi líquid (intern) i la protecció de l'oïda interna davant de lesions produïdes per un excés d'energia sonora externa mitjançant reflexos. 3) *Oïda interna*: la còclea és l'òrgan principal d'aquesta zona que representa el final de la cadena del processament mecànic del so on es filtra la senyal sonora, i es genera la transducció d'impulsos nerviosos.

La **còclea** està dividida per la membrana basilar, lloc en on es troba l'òrgan de Corti, i per la membrana de Reissner. L'òrgan de Corti conté cèl·lules ciliars, internes i externes, que actuen com a transductors de senyals sonores a impulsos nerviosos. Els moviments dels cilis en una direcció determinada fa que la conductivitat de les cèl·lules ciliars augmenti. Un canvi de potencial a la membrana modula una corrent elèctrica que flueix entre aquestes cèl·lules ciliars. Aquest fet produeix l'activació dels terminals nervioses generant un impuls nerviós que viatja fins al cervell.

Per tal d'analitzar el sistema auditiu es produeix una estimulació de sons amb característiques conegudes (freqüència, intensitat, velocitat d'estimulació...) i un posterior registre de l'activitat elèctrica generada per les neurones de la via auditiva. Aquesta és una tècnica neurofisiològica que permet l'obtenció de dades de manera ràpida, reproduïble, quantitativa i és una tècnica no invasiva (Willott, 2006; Zhou et al., 2006). Aquesta tècnica ha estat molt utilitzada en els últims anys en la recerca de l'audició relacionada amb malalties genètiques.

El registre típic d'ABR en rosegadors és una ona formada per 4-5 pics corresponents a diferents estacions nervioses de la via auditiva perifèrica i central (tronc cerebral). L'estimulació auditiva pot realitzar-se mitjançant dos tipus de sons: 1) *Click*: és un estímul auditiu inespecífic compost per l'espectre de freqüències audibles i que activa a totes les neurones del receptor auditiu. 2) *To*: és un estímul auditiu format per una freqüència específica que estimula una regió de l'òrgan de Corti.

Primerament es va analitzar la funció auditiva global en què els animals es van sotmetre a un estímul de multifreqüència (*click*) produint una activació general de la còclea. Tant els animals *wild-type* com els animals *knock-out* mostraven llindars dins del rang de la normalitat. No s'observaven diferències significatives entre els dos grups (dades no mostrades).

El registre de potencials evocats auditius està format per una sèrie de pics característics que es corresponen a diferents estacions de la via auditiva (pics I-V). Cada un d'aquest pics està caracteritzat per un valor de **latència** (PL). La latència és el temps d'aparició de la resposta des de l'emissió de l'estímul (ms), i ens informa sobre la velocitat de conducció de l'estímul nerviós. En el ratolí els pics importants són els quatre primers.

En els ratolins *wild-type* i *knock-out* se'ls va aplicar una latència determinada amb una intensitat equivalent de 15-20 decibels per sobre del llindar auditiu. La figura 43 A mostra que no hi havia diferències estadísticament significatives entre els genotips per les latències analitzades. Aquests resultats estaven indicant que possiblement no hi havia dany en els nervis auditius.

A banda de l'estudi de la latència, també es va estudiar l'**amplitud** dels pics ABR. L'amplitud és un indicador indirecte de l'activitat elèctrica de les neurones que conformen les diferents estacions de la via auditiva. Es pot mesurar de manera absoluta (des de la línia isoelèctrica fins al vèrtex del pic) o de manera relativa (amplitud pic-vall). La figura 43 B mostra que no hi havien diferències estadísticament significatives en les amplituds mesurades de les diferents estacions auditives entre els ratolins *wild-type* i els ratolins *knock-out*, corroborant que els animals deficientes en MLC1 no mostraven dany en el sistema auditiu.

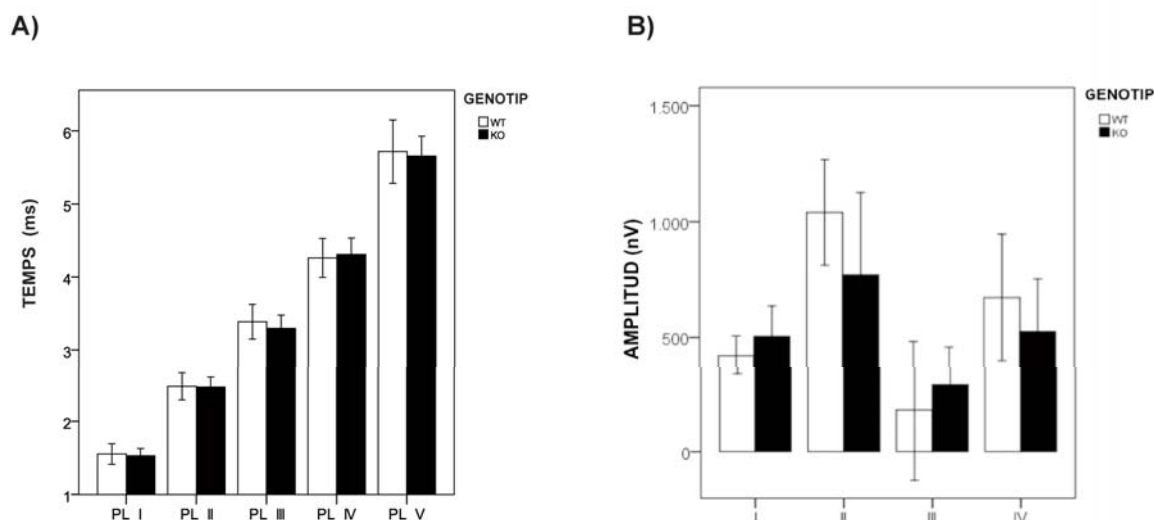


Figura 43. Estudi de la funció auditiva mitjançant ABR A) Gràfica dels temps de latència de les diferents estacions auditives. B) Gràfica d'amplitud per cada estació nerviosa que genera la via auditiva. Nombre d'animals utilitzats per a l'estudi: n WT=8; n KO=8. Unitats de latència: mil·lisegons. Unitats d'amplitud: volts. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Estadística: ns, *t*-Student no aparellada.

Aquests resultats corresponen als anàlisis fets a l'edat de 3 mesos. Aquests mateixos animals van ser analitzats posteriorment a l'edat de 6 i 8 mesos. En aquest cas tampoc es van obtenir diferències significatives entre els diferents genotips (dades no mostrades).

En els pacients que s'havien estudiat fins al moment sempre havien mostrat els potencials evocats auditius a nivells normals (van der Knaap et al., 2012). Per tant, els resultats obtinguts a partir dels ABR coincidien amb el que s'ha descrit en humans.

No es van realitzar estudis en els nervis perifèrics ni en el sistema somatosensorial ja que el model *knock-out Mlc1* no mostrava danys en el SNC i es va pensar que possiblement no tingués defectes en el SNP.

3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN EL RATOLÍ KNOCK-OUT

Durant els primers mesos de la caracterització del ratolí *knock-out*, el nostre grup juntament amb el grup de la Dra. Marjo van der Knaap, van identificar el segon gen implicat en la malaltia MLC. Aquest gen s'anomena *GLIALCAM* o *HEPACAM*, el qual codifica per una proteïna d'adhesió i de funció desconeguda anomenada també GlialCAM. Es va analitzar un grup de pacients que presentaven les característiques típiques de MLC però no tenien el gen *MLC1* mutat sinó que tenien mutat el gen *GLIALCAM*. Alguns d'aquests pacients es van caracteritzar per mostrar mutacions de tipus dominant, els quals mostraven un fenotip

benigne, i altres amb mutacions de tipus recessiu, els quals mostraven un fenotip clàssic de la malaltia MLC (López-Hernández et al., 2011a).

En el sistema nerviós, l'expressió de GlialCAM en la substància blanca se centra als peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. També s'ha observat expressió de la proteïna en les regions de contacte entre la mielina, en els axons i en oligodendròcits (Favre-Kontula et al., 2008; López-Hernández et al., 2011a).

L'any 2012 el nostre grup, juntament amb el grup del Dr. Michael Pusch (Institut de Biofísica, Genova, Itàlia), va descriure la proteïna GlialCAM com a subunitat auxiliar del canal de clorur CIC-2. CIC-2 és una proteïna codificada pel gen *CLCN2* i pertany a la família de canals/transportadors de clorur CIC (Jentsch et al., 2005). CIC-2, de la mateixa manera que MLC1 i GlialCAM, es localitza en els peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis i a la glia de Bergmann, i també colocalitza amb GlialCAM en tractes mielínics (Blanz et al., 2007; Jeworutzki et al., 2012).

Així doncs, el següent pas era estudiar les proteïnes GlialCAM i CIC-2 en el ratolí *Mlc1 knock-out*.

3.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA GlialCAM

De la mateixa manera que s'havia fet per l'estudi de la proteïna MLC1, es van obtenir mostres de cervell i cerebel d'animals *wild-type* i *knock-out* per a realitzar estudis de localització i de quantificació de GlialCAM.

Per a l'estudi de la localització de la proteïna es van realitzar immunofluorescències de doble marcatge amb GFAP. Sorprenentment, en els teixits del *knock-out* es va observar que l'absència de MLC1 afectava a la localització de GlialCAM, trobant-se aquesta deslocalitzada, principalment en els processos apicals de la glia de Bergmann (Figura 44 A, cerebel). En el cas de la seva localització astrocitària al voltant dels vasos sanguinis, es podia observar una marca més discreta de la proteïna en algunes regions en el teixit del ratolí *knock-out* respecte el teixit del ratolí *wild-type* (Figura 44 A, cervell).

Posteriorment es va quantificar la proteïna GlialCAM, tant en el cervell com en el cerebel. Els estudis mitjançant WB van senyalar que els nivells d'expressió de la proteïna no variaven entre els teixits *wild-type* i *knock-out* (Figura 44 B). Aquests resultats de la localització i de l'expressió de GlialCAM en el ratolí *knock-out* indicaven que la proteïna es mantenia íntegra en el teixit (no semblava degradar-se) però no es trobava en la seva localització habitual mostrant-se deslocalitzada.

Aquests resultats, però, no indicaven el mateix que s'havia observat anteriorment en el model *knock-down* de MLC1. Estudis realitzats per un antic company de laboratori, el Dr. Xavier Capdevila, mostraven que els astròcits en cultiu mancats de la proteïna MLC1 presentaven una correcta localització de GlialCAM a les unions astrocitàries. Aquesta diferència es podria donar per diferents fets. Primerament perquè els models *knock-down* no eliminen la proteïna per complet. En segon lloc, també podria ser que en els models *in vitro* fos necessària la presència d'alguna altra molècula que *in vivo* sí que hi és. Finalment, també podria ser que depengués d'algún estímul concret per donar-se lloc aquesta deslocalització *in vitro* per part de GlialCAM.

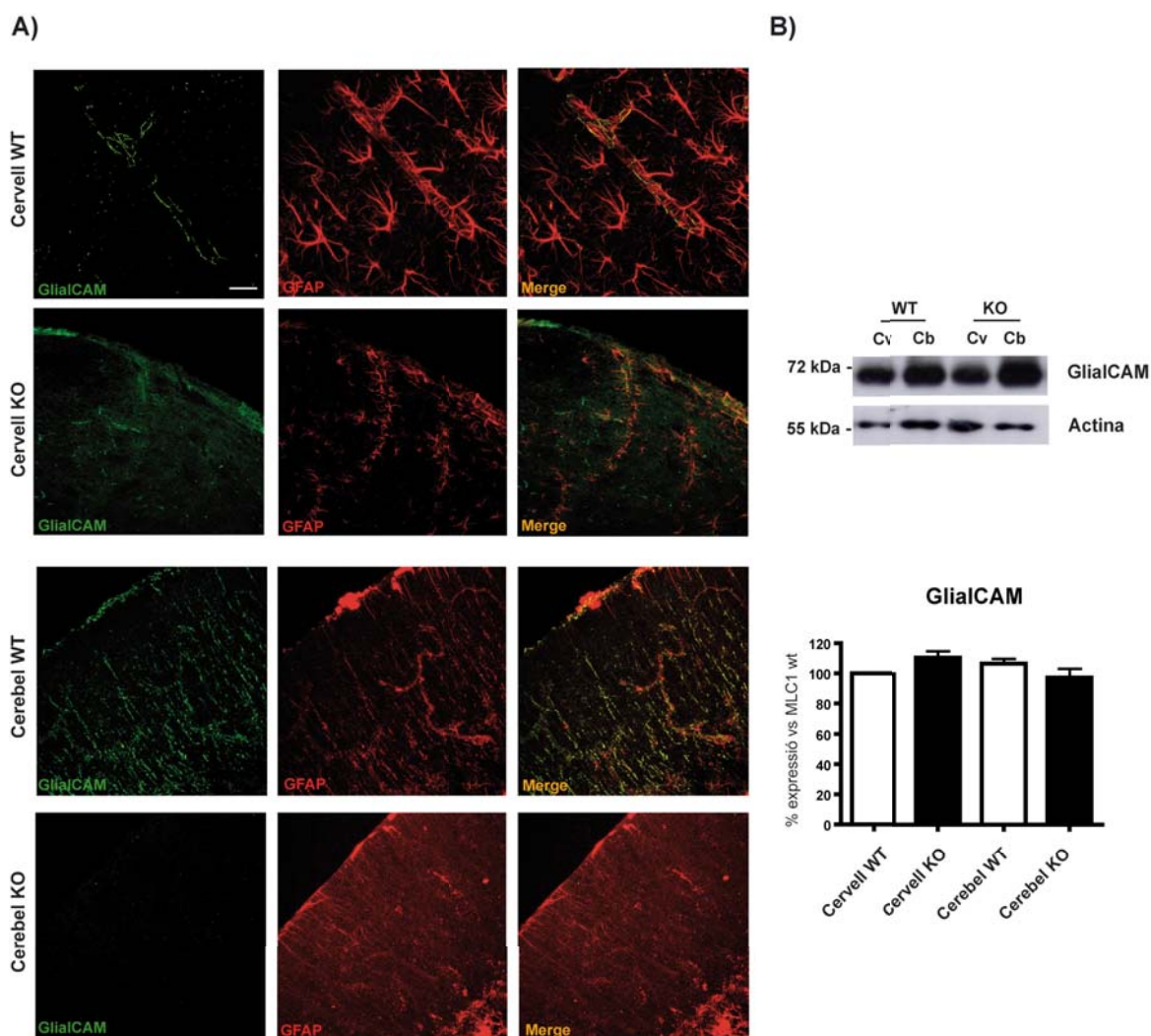


Figura 44. Anàlisi de la proteïna GlialCAM en el ratolí *knock-out*. A) Estudi de la localització de GlialCAM a partir d'immunofluorescència de doble marcatge amb GFAP fetes en cervell i cerebel dels ratolins *knock-out* i *wild-type*. Dades corresponents a 5 experiments independents. B) Quantificació de la proteïna GlialCAM mitjançant WB a partir d'extractes de membrana de cervell i de cerebel d'animals *knock-out* i *wild-type*. Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal i GFAP amb un anticòs comercial. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Dades corresponents a 7 experiments independents. WT:*wild-type*; KO:*knock-out*. Cv:cervell; Cb:cerebel. Estadística: ns; *t*-Student no aparellada. . Barra: 20 μ m.

A part de la localització astrocitària, anteriorment s'havia descrit que GlialCAM i MLC1 també colocalitzaven en cèl·lules ependimals (López-Hernández et al., 2011a; Teijido et al., 2004, 2007). Mitjançant estudis de microscòpia electrònica amb col·laboració amb el Dr. Albert Martínez, es va observar que realment ni MLC1 ni GlialCAM es troben localitzades en aquest tipus cel·lular.

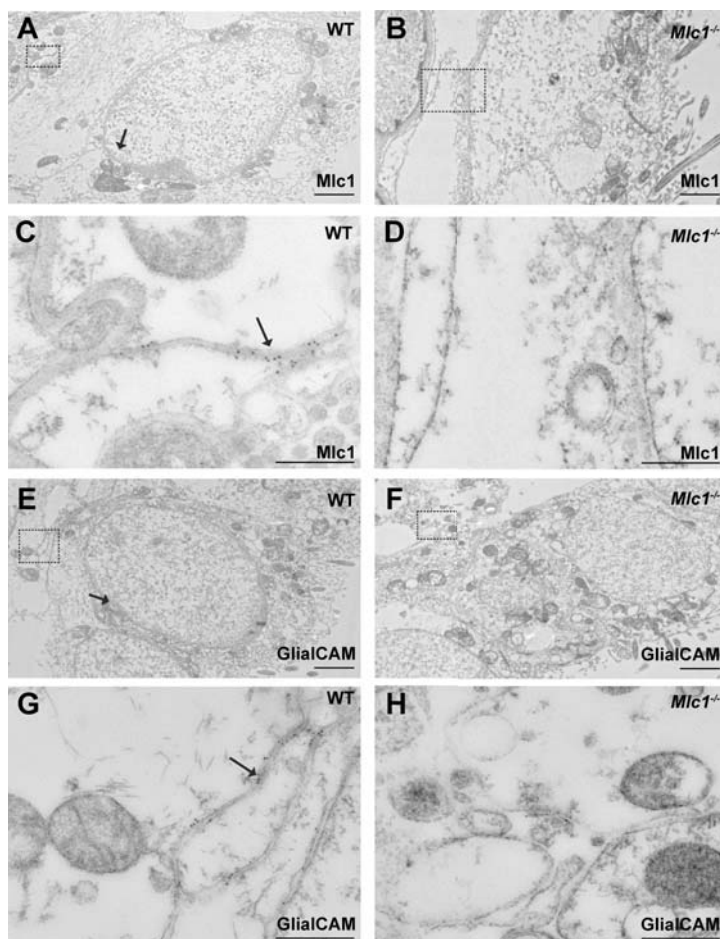


Figura 45. Estudis de localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM en el cervell del ratolí *knock-out* mitjançant microscòpia electrònica. A, C) Localització de la proteïna MLC1 en els contactes entre astròcits en teixit del ratolí *wild-type* (fletxes). B, D) Absència de la proteïna MLC1 en teixit del ratolí *knock-out*. E, G) Localització de GlialCAM en els contactes entre astròcits en teixit del ratolí *wild-type* (fletxes). F, G) Deslocalització de GlialCAM en el teixit del ratolí *knock-out*. WT: *wild-type*; KO: *Mlc1*^{-/-}. Barres: A, B, E, F :2 µm; C, D, G, H: 500 nm.

Les imatges realitzades amb el teixit del ratolí *wild-type* van demostrar que MLC1 i GlialCAM realment es localitzaven en els contactes entre els astròcits que es trobaven situats a continuació d'aquestes cèl·lules ependimals (Figura 45 A, C, E, G). Per altra banda, aquests estudis mitjançant el teixit del ratolí *knock-out*, van reafirmar l'absència de la proteïna MLC1 en els contactes astrocitàris (Figura 45 B, D) i la deslocalització per part de GlialCAM (Figura 45 F, H).

3.2 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2

Si GlialCAM es veia afectada per l'absència de MLC1, que passaria amb CIC-2? En un principi s'havia hipotetitzat que CIC-2 podria ser un bon candidat a ser el segon gen implicat

en la malaltia ja que el model *knock-out* de CIC-2 mostrava un fenotip vacuolitzant similar al que presentaven els pacients amb MLC (Blanz et al., 2007). Posteriorment, es van realitzar estudis en 18 pacients, que presentaven fenotip de MLC però que no tenien el gen *MLC1* mutat. Alguns pacients presentaven un canvi de nucleòtid en el gen però els estudis d'electrofisiologia van provar que aquests canvis no afectaven al corrent del canal CIC-2 (Scheper et al., 2010), per tant es va descartar com a gen candidat de la malaltia.

Posteriorment, es van realitzar estudis de proteòmica per tal de trobar possibles proteïnes candidates a interaccionar amb GlialCAM. Aquests estudis van demostrar que les proteïnes que més copurificaven amb GlialCAM eren MLC1 i CIC-2, i es va descriure a GlialCAM com a subunitat auxiliar de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012).

Així doncs, de la mateixa manera que per GlialCAM, es va analitzar la proteïna CIC-2 en el cervell i en el cerebel del ratolí *knock-out*.

Mitjançant estudis d'immunofluorescència de doble marcatge amb GFAP, també es va observar que la localització de CIC-2 en els astròcits situats al voltant dels vasos sanguinis, no es veien afectats ja que CIC-2 semblava mantenir la seva localització correctament (Figura 46 A, cervell). En la glia de Bergmann, en canvi, CIC-2 és trobava deslocalitzada i de manera difusa (Figura 46 A, cerebel) de la mateixa manera que s'havia observat en GlialCAM.

També en aquest cas es van dur a terme estudis de quantificació de CIC-2 mitjançant WB a partir d'extractes de membrana. Els resultats de la quantificació van indicar que els nivells d'aquesta proteïna es veien reduïts fins al 50% en el cerebel i que es mantenien en el cervell (Figura 46 B). Aquests resultats podrien indicar que CIC-2 es podria estar degradant en la glia de Bergmann en absència de MLC1.

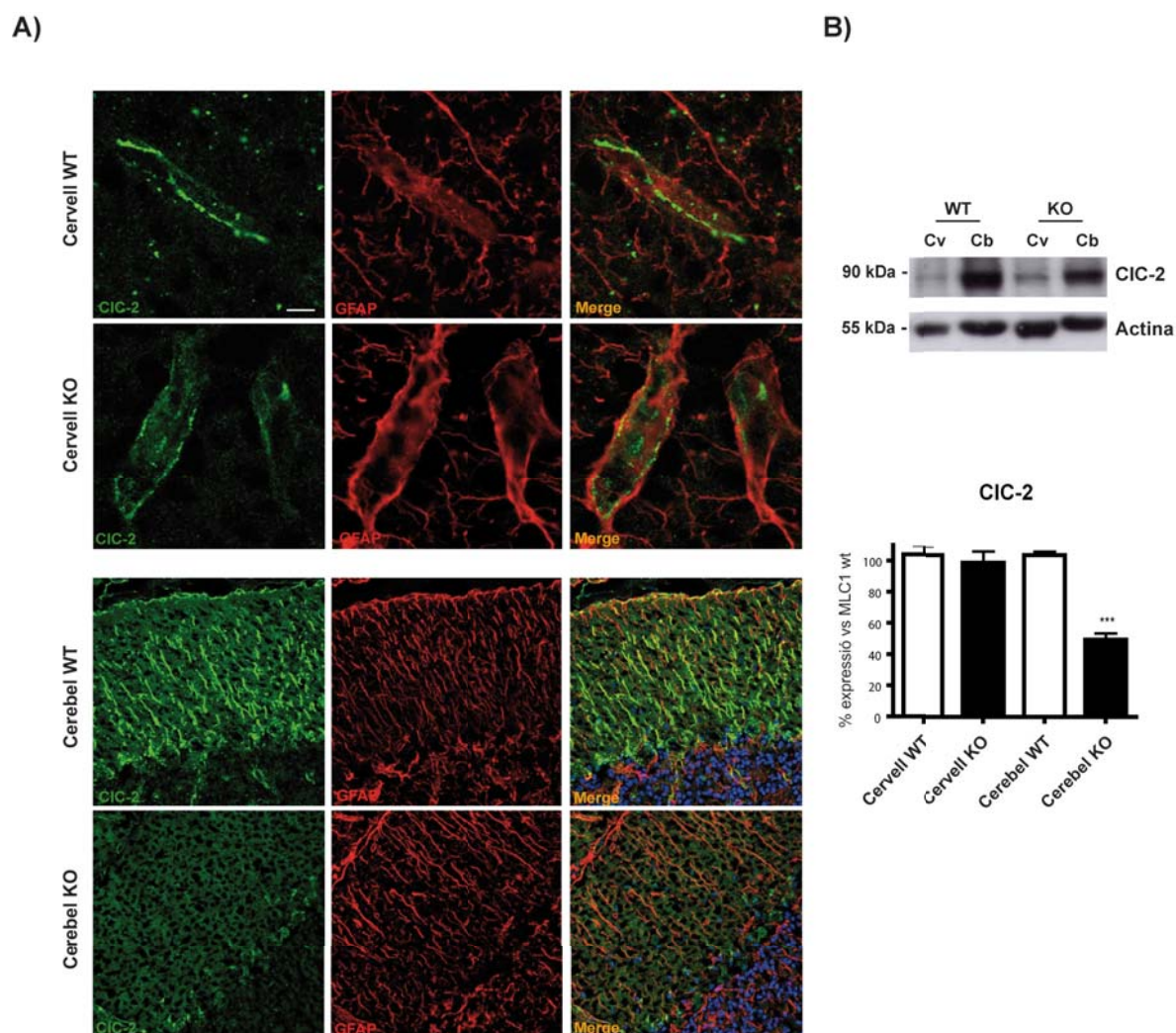


Figura 46. Anàlisi de la proteïna CIC-2 en el ratolí *knock-out*. A) Estudi de la localització de la proteïna CIC-2 a partir d'immunofluorescència de doble marcatge amb GFAP fetes en cervell i cerebel dels ratolins *knock-out* i en teixit del ratolí *wild-type*. Dades corresponents a 4 experiments independents. B) Quantificació de la proteïna CIC-2 mitjançant WB a partir d'extractes de membrana de cervell i cerebel d'animals *knock-out* i *wild-type*. Es detecta CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal i GFAP amb un anticòs comercial. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Dades corresponents a 7 experiments independents. WT:*wild-type*; KO:*knock-out*. Cv:cervell; Cb:cerebel. Estadística:

el desenvolupament d'aquesta. Recentment, s'ha publicat un estudi on es descriu que mutacions en el gen *CLCN2* dona lloc a un tipus de leucoencefalopatia amb edema intramielínic (Depienne et al., 2013). Fins al moment mai s'havia observat cap tipus d'interacció directa entre les proteïnes MLC1 i CLC-2. Amb aquests resultats es podia concloure que la proteïna CIC-2 podria estar involucrada en el desenvolupament de la malaltia per la seva relació directa amb GlialCAM, ja que aquesta es veia afectada per la manca de MLC1.

A partir d'aquest moment feia falta estudiar més detingudament aquesta proteïna a diferents nivells per intentar trobar una relació fisiològica entre MLC1, GlialCAM i CIC-2.

Va ser en aquest punt quan es va decidir col·laborar amb el grup del Dr. Thomas Jentsch (FMP-Berlín). El grup del Dr. Jentsch disposava del ratolí *knock-out* de CIC-2. En aquell moment estava caracteritzant el ratolí *knock-out* de GlialCAM i un ratolí *knock-in* amb la mutació G89S de GlialCAM. Així doncs, es va fer un estudi comparatiu de tots aquests models per intentar arribar a entendre millor la fisiopatologia de MLC i la relació fisiològica d'aquest complex.

4. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MLC1, GlialCAM I CIC-2 EN ELS OLIGODENDRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

Es coneix que MLC1 no es troba localitzada en oligodendròcits a diferència de GlialCAM i CIC-2 (López-Hernández et al., 2011a; Teijido et al., 2004). El fet de veure que GlialCAM i CIC-2 es trobaven deslocalitzades en astròcits per la manca de MLC1 va fer pensar que potser els oligodendròcits també es podien veure afectats.

Estudis realitzats pel grup del Dr. Jentsch en oligodendròcits localitzats en tractes del cerebel, van demostrar que MLC1, GlialCAM i CIC-2 s'agrupaven al voltant del soma dels oligodendròcits del ratolí *wild-type*. MLC1 es detectava en els astròcits veïns i possiblement el fet de detectar-la en el soma dels oligodendròcits, podria ser causa dels contactes que formen els processos astrocítics amb els oligodendròcits. Els estudis de localització es van realitzar juntament amb un marcador de citoplasma d'oligodendròcits (APC) (Figura 47).

En els oligodendròcits del teixit *knock-out* s'observava que GlialCAM i CIC-2 no podien agrupar-se al voltant del soma trobant-se deslocalitzades també en aquest tipus cel·lular. Aquests resultats indicaven que la manca de MLC1, també causava un defecte sobre GlialCAM i CIC-2 en els oligodendròcits.

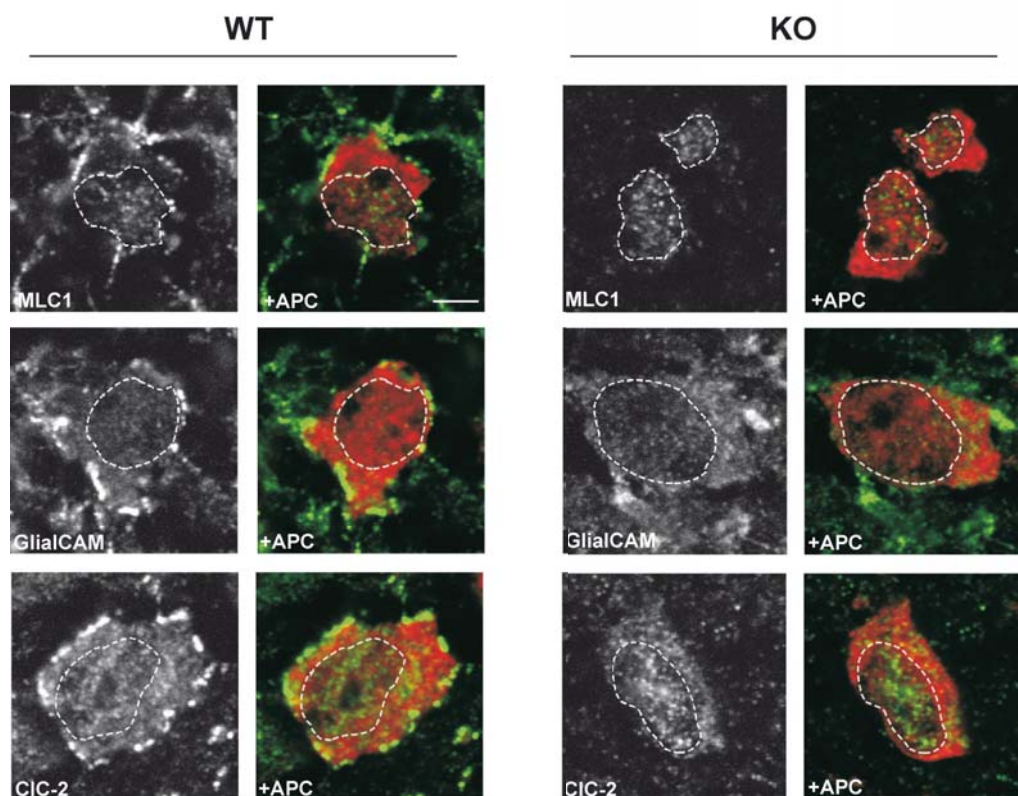


Figura 47. Anàlisi de les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC-2 en els oligodendròcits del ratolí *knock-out*. Estudis d'immunofluorescència de doble marcatge amb APC (proteïna *Adenomatous polyposis coli*), marcador de citoplasma. Les línies discontinües marquen la localització del nucli de la cèl·lula. WT: *wild-type*; KO : *knock-out*. Barra: 0,5 μm .

5. MESURA DE LES CORRENTS DE CLORUR MODULADES PER CIC-2 EN EL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

El grup del Dr. Thomas Jentsch també va realitzar els estudis electrofisiològics en llesques del cervell del ratolí *knock-out* mitjançant la tècnica de *Patch-Clamp*.

Primerament, es van centrar en mesurar les corrents de CIC-2 en la glial de Bergmann, ja que era la regió on principalment s'hi troben localitzades MLC1, GlialCAM i CIC-2, i perquè era la regió on s'havia observat la major deslocalització per part de GlialCAM i CIC-2 en absència de MLC1. En el teixit del ratolí *wild-type* en condicions isoosmòtiques s'observaven traces típiques de CIC-2 com si no estigués interaccionant amb GlialCAM (Figura 48 A). També es podia observar que en aquestes condicions hi havia una certa inactivació de les corrents. En canvi, en el teixit del ratolí *knock-out* en condicions isoosmòtiques (Figura 48 B), tot i que també mostrava les traces típiques de CIC-2 quan es troba sol, no s'observava inactivació. Quan es registrava corrents en la glia de Bergmann del ratolí *wild-type* en

condicions hipoosmòtiques ja no hi havia inactivació del canal, en canvi en el teixit del *knock-out* en condicions hiperosmòtiques sí que s'observava inactivació de les corrents. Aquests resultats indicaven que els astròcits de la glia de Bergmann del ratolí *knock-out* en condicions normals estaven més inflats que els del ratolí *wild-type*. El que no s'entenia era perquè s'observaven traces típiques de CIC-2 sol si en la glia de Bergmann aquesta proteïna colocalitza amb GlialCAM i era la regió on s'havia observat la deslocalització d'aquestes dues proteïnes en absència de MLC1.

D'altra banda, també es van estudiar els oligodendròcits. El fenotip vacuolitzant s'observa en major part en la mielina i en aquestes cèl·lules glials s'havia observat que també hi havia una deslocalització per part de GlialCAM i CIC-2. Els estudis electrofisiològics realitzats en els oligodendròcits del ratolí *wild-type*, mostraven les traces típiques del canal CIC-2 quan es troba amb GlialCAM (Figura 48 C). En canvi, els oligodendròcits de ratolí *knock-out* no generaven corrents a potencials positius indicant que no hi havia presència de GlialCAM. A part, l'amplitud de les corrents havien disminuït donant lloc a una inactivació del canal (Figura 48 D).

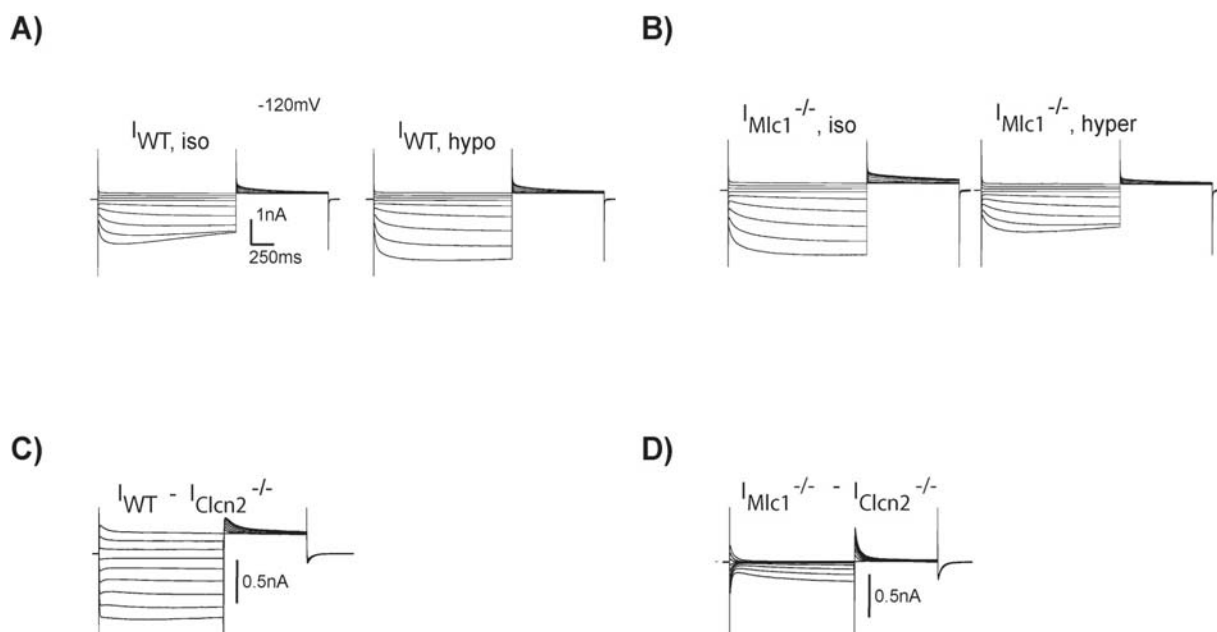


Figura 48. Mesura de les corrents de CIC-2 en la glia de Bergmann i en oligodendròcits. A) Mesura de les corrents de CIC-2 en la glia de Bergmann del ratolí *wild-type* en condicions isoosmòtiques i hipoosmòtiques. B) Mesura de les corrents de CIC-2 en la glia de Bergmann del ratolí *knock-out* en condicions isoosmòtiques i hiperosmòtiques. C) Mesura de les corrents de CIC-2 en els oligodendròcits del ratolí *wild-type*. D) Mesura de les corrents de CIC-2 en els oligodendròcits del ratolí *knock-out*. WT: *wild-type*; KO/ $Mlc1^{-/-}$: *knock-out*. Imatge modificada de (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Aquests resultats indicaven que la major afectació del canal de Cl⁻ CIC-2 per l'absència de MLC1 s'observava en els oligodendròcits.

6. ESTUDI D'ALTRES PROTEÏNES EN EL RATOLI KNOCK-OUT

MLC1 és una proteïna de membrana que en el sistema nerviós es troba localitzada en els peus astrocitaris i en unions cel·lulars. Són moltes les proteïnes que es troben en la membrana astrocitària i que podrien tenir una funcionalitat juntament amb MLC1. Fins al moment es coneix que MLC1 colocalitza parcialment amb proteïnes d'unions com són ZO-1 i occludina (unions *tight*), amb proteïnes com β -catenina i N-caherina (unions adherents) i amb connexina-43 (unions *gap*) (Duarri et al., 2011).

Es van analitzar algunes proteïnes de les quals es creu que podrien mantenir una relació fisiològica amb MLC1. Els resultats van indicar que la majoria de proteïnes conservaven els mateixos nivells d'expressió en els teixits del *knock-out* que en els teixits *wild-type*. El canal *inward rectifying* Kir 4.1 era l'únic marcador que presentava nivells d'expressió menors en el cerebel del *knock-out* (Figura 49). Per altra banda, estudis de localització en el ratolí *knock-out* per *Mlc1*, realitzats pel grup del Dr. Thomas Jentsch, mostraven que la localització de la proteïna Kir 4.1, en els peus astrocitaris al voltant del vasos sanguinis, no es veia afectada per la manca de MLC1 (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Aquests resultats mostraven que cap d'aquestes proteïnes estudiades semblaven estar afectades per la manca de MLC1. En el cas del canal Kir 4.1, s'haurien de realitzar més estudis per tal de saber amb certesa si realment aquest canal es veu afectat per la falta de MLC1 i si podria tenir alguna implicació en la malaltia.

No s'han pogut realitzar estudis de localització degut a que els anticossos dels quals es disposava no eren del tot específics per la tècnica d'immunofluorescència.

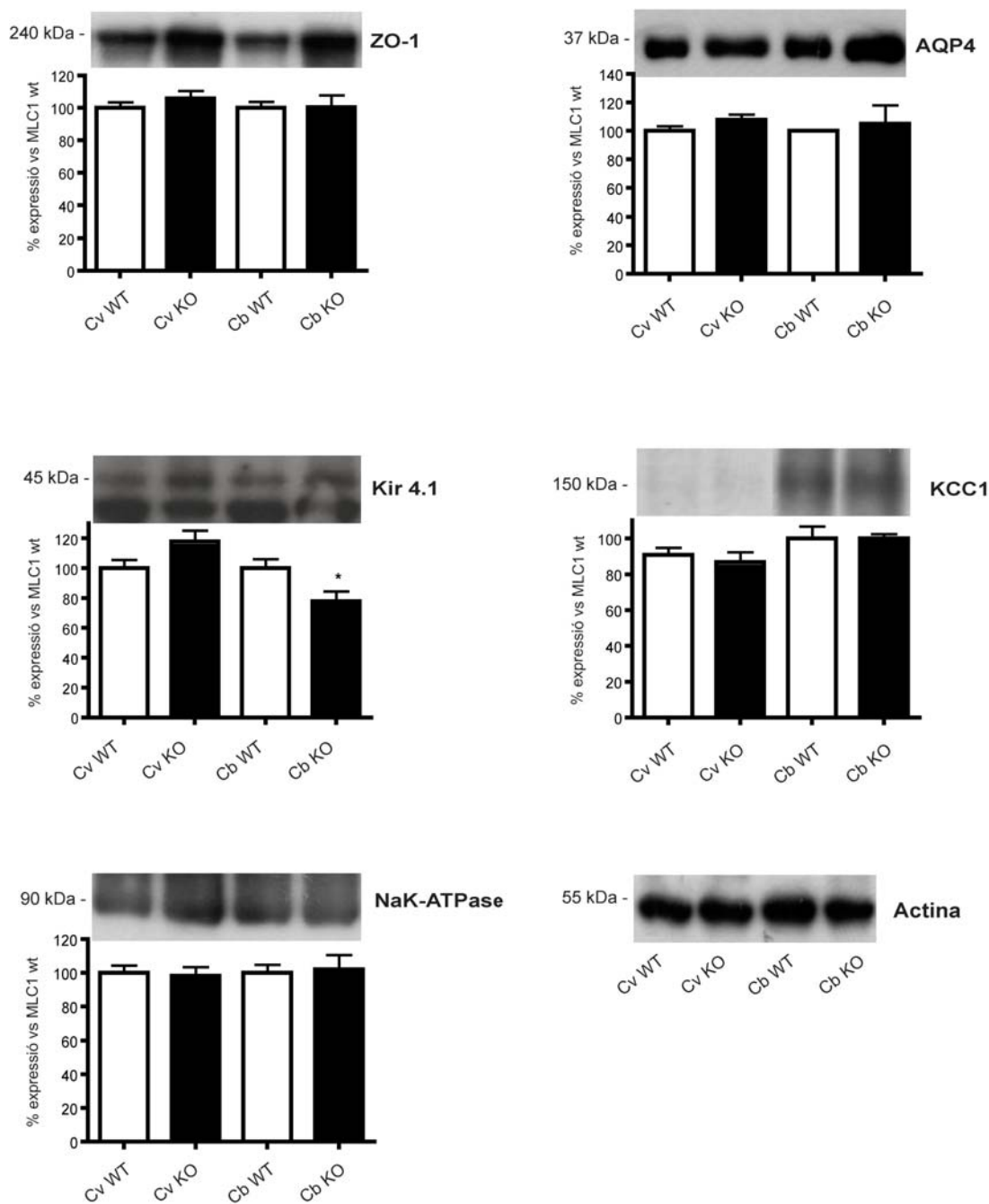


Figura 49. Anàlisi de marcadors proteics en el cervell i en el cerebel del ratolí *knock-out*. Estudi dels nivells d'expressió mitjançant WB a partir d'extractes de membrana. ZO-1, dades corresponents a 3 experiments independents; AQP4, dades corresponents a 5 experiments independents; Kir 4.1, dades corresponents a 6 experiments independents; KCC1, dades corresponents a 5 experiments independents; NaK-ATPase dades corresponents a 6 experiments independents. Es detecten les proteïnes utilitzant anticossos comercials. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. WT:wild-type; KO:knock-out. Cv:cervell; Cb:cerebel. Estadística: * $p < 0,05$ *t*-Student no aparellada

7. ESTUDI DE LES PROTEÏNES MLC1, GlialCAM I CIC-2 EN LA MEDUL·LA ESPINAL DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

Anteriorment s'havia descrit que la proteïna MLC1 també es localitzava en la medul·la espinal, més concretament en els astròcits que es trobaven al voltant dels vasos sanguinis, de la mateixa manera que es troba en el cervell i en el cerebel (Teijido et al., 2007).

En la medul·la del ratolí *knock-out* també es va estudiar la presència de les proteïnes implicades en la malaltia: MLC1, GlialCAM i CIC-2.

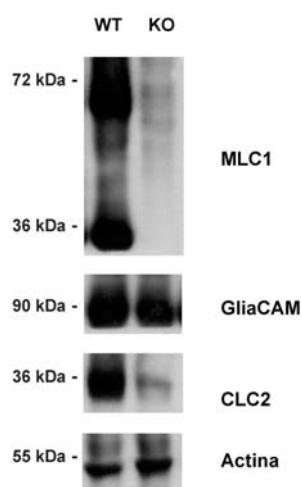


Figura 50. Anàlisi de les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC 2 en la medul·la espinal del ratolí *knock-out*. Estudi dels nivells d'expressió mitjançant WB a partir d'extractes de membrana de medul·la espinal. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal, GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal i CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega.

A partir de la tècnica de WB utilitzant extractes de membrana de medul·la provinents de ratolí *wild-type* i de ratolí *knock-out*, és va observar, primerament, que la proteïna MLC1 es trobava absent en el teixit de l'animal *knock-out*. Posteriorment es van analitzar els nivells d'expressió de les proteïnes GlialCAM i CIC-2. Aquestes es comportaven de la mateixa manera que en el cerebel. Els nivells d'expressió de GlialCAM no variaven en l'extracte de medul·la del *knock-out* respecte al del *wild-type*. En canvi, CIC-2 es mostrava en menor proporció tal i com s'havia observat en el cerebel (Figura 50).

No s'han pogut realitzar estudis de localització amb medul·la de moment, però seria interessant continuar l'estudi de l'animal *knock-out* en aquesta regió i en diferents regions del sistema nerviós perifèric, on també s'havia descrit anteriorment la presència de la proteïna MLC1 (Teijido et al., 2007).

Anteriorment també s'havia descrit la localització de la proteïna MLC1 a la retina, principalment en les cèl·lules ganglionars (Teijido et al., 2007). Estudis recents del grup (dades no mostrades) i també realitzats pel grup del Dr. Thomas Jentsch senyalen que en

animals *knock-out* per *Mlc1* la retina no es veu afectada indicant que la marca observada anteriorment de la proteïna MLC1 en aquesta localització era inespecífica (Hoegg-Beiler et al., 2014).

PART 2: MODEL ASTROCITARI

Fins al moment, en el nostre laboratori només s'havia pogut treballar amb models *in vitro* ja que no es disposava de cap model animal per a l'estudi de la malaltia. Antics membres del grup, com són la Dra. Anna Duarri i el Dr. Xavier Capdevila, van desenvolupar models *knock-down* per a les proteïnes MLC1 i GlialCAM com aproximació per a l'estudi de la deficiència d'aquestes proteïnes (Capdevila-Nortes et al., 2013; Duarri et al., 2011).

La generació del ratolí *knock-out* també ha permès poder realitzar estudis *in vitro* mitjançant els astròcits mancats de la proteïna MLC1.

1. CARACTERITZACIÓ DELS ASTROCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

Els astròcits s'obtenien a partir d'un cultiu d'escorça i d'hipocamp. Els primers estudis de la proteïna MLC1 en un cultiu d'astròcits indicaven que el nivell d'expressió augmentava amb el temps i que la proteïna presentava una localització citoplasmàtica, contrària al que s'havia descrit *in vivo*.

Aquests resultats feien pensar que l'expressió i la localització de MLC1 en els astròcits en cultiu podia dependre de la quiescència o de la diferenciació cel·lular. Després de dur a terme diferents experiments, es va observar que mantenint 3 setmanes les cèl·lules amb AraC (agent químic que indueix la parada en cicle en la fase G0/G1), els astròcits aconseguien una morfologia de cèl·lula plana i estrellada. En aquestes condicions MLC1 augmentava la seva expressió i es localitzava en els processos astrocitaris (Duarri et al., 2011).

1.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1 EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

Per a obtenir els cultius d'astròcits es van realitzar creuaments entre els animals F2 de cada genotip. Per tant les cries que s'utilitzaven per a generar els cultius eren F3. Es va fer d'aquesta manera ja que els animals F2 es genotipen a les 3 setmanes de vida i per a obtenir els cultius primaris es necessari utilitzar els animals en els primers dies de vida (P0-P2).

En primer lloc es van realitzar estudis mitjançant WB d'extractes de cervells i cerebels de cries d'entre P0-P2 per tal d'assegurar-nos que el genotip de les cries analitzades era el correcte (Figura 51).

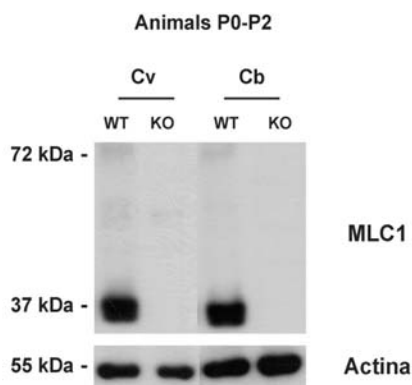


Figura 51. Anàlisi de la proteïna MLC1 en animals *wild-type* i *knock-out* a P0-P2. Estudis realitzats mitjançant WB d'extractes de cervell i cerebel on es va detectar la proteïna MLC1. WT:*wild-type*; KO:*knock-out*. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Cv:cervell; Cb:cerebel.

En els astròcits *wild-type* mostraven la proteïna MLC1 es localitzava clarament concentrant-se a les unions cel·lulars. En canvi, i com era d'esperar, en el cultiu d'astròcits *knock-out* hi havia una clara absència de la proteïna (Figura 52 A). Els estudis de WB van corroborar que la proteïna MLC1 es trobava absent en l'extracte preparat a partir de les cèl·lules *knock-out* (Figura 52 B).

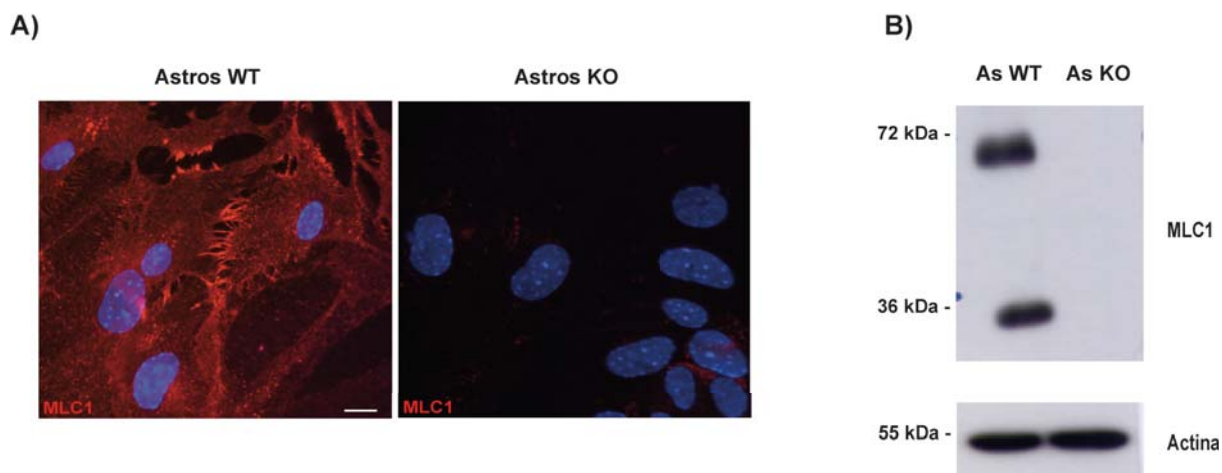


Figura 52. Anàlisi de la proteïna MLC1 dels astròcits del ratolí *knock-out*. A) Estudis de la localització de la proteïna MLC1 a partir d'immunofluorescència en astròcits (Astros) del ratolí WT i dels ratolins KO. B) Estudis de l'expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB a partir d'extractes d'astròcits (As) dels ratolins WT i dels ratolins KO. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. WT:*wild-type*; KO:*knock-out*. Dades corresponents a 6 experiments independents. Barra : 20 µm.

1.2 ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

Anteriorment, el nostre grup va descriure que el model *knock-down* per MLC1 presentaven vacuoles intracel·lulars en els astròcits de la mateixa manera que s'havia observat en els pacients (Duarri et al., 2011).

Es van realitzar estudis amb la *Calcein AM* com a tècnica de contrast, per a observar si les cèl·lules dels animals *knock-out* també presentaven vacuoles.

Els resultats van demostrar que el cultiu primari d'astròcits del ratolí *knock-out* presentava vacuoles, en alguns casos per tot el citoplasma. En el cas del cultiu d'astròcits del ratolí *wild-type* es va observar algun cas on també hi havia la presència d'alguna vacuola, però de mida més petita (Figura 53 A). Per saber si realment els astròcits del *knock-out* presentaven una major quantitat de vacuoles degut a la falta de MLC1, aquestes es van contar i es va fer un percentatge de les cèl·lules que presentaven vacuoles respecte el nombre de cèl·lules totals. Es va considerar que una cèl·lula presentava vacuoles quan en tenia 3 o més i quan aquestes eren majors d'1 μm aproximadament. El comptatge mostrava que els astròcits de ratolí *knock-out* presentaven un percentatge significativament major de vacuoles respecte els astròcits de ratolí *wild-type* (Figura 53 B).

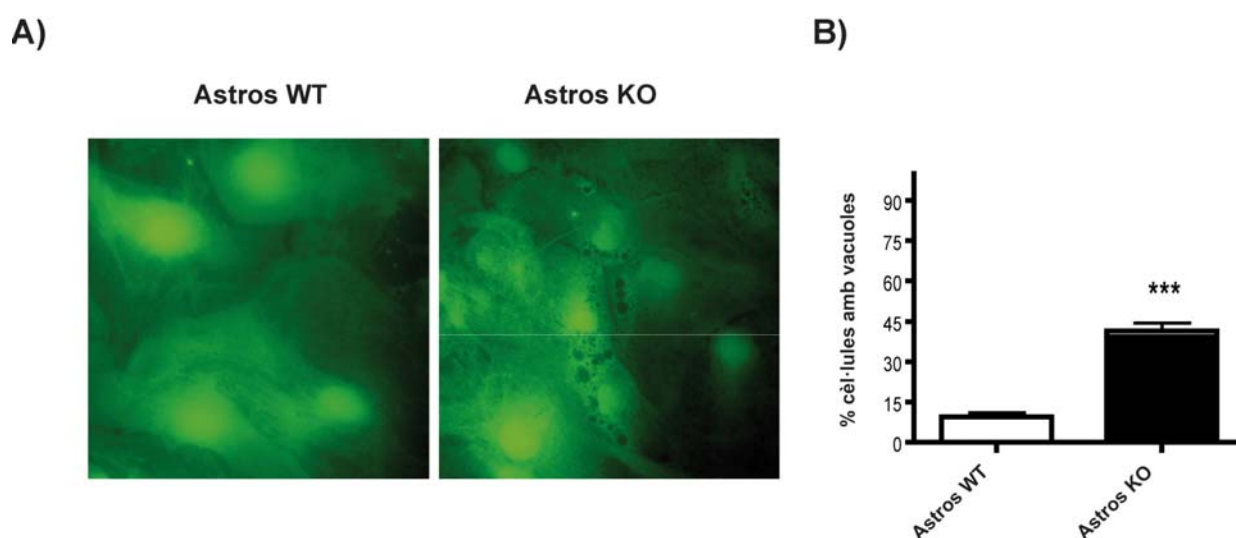


Figura 53. Estudi del fenotip vacuolitzant en els astròcits de ratolí *knock-out* mitjançant *Calceina AM*. A) Imatges dels astròcits (Astros) de ratolí WT i KO sense fixar els quals s'han incubat amb *Calceina AM* per tal de poder observar la presència de vacuoles. B) Quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars majors d'1 μm . Dades corresponents a 3 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules totals analitzades: astròcits WT: *wild-type* (n=333) i astròcits KO: *knock-out* (n=350). Estadística: *** p<0,001 *t*-Student no aparellada.

Estudis de complementació realitzats en el model *knock-down* de MLC1 mostraven que una sobreexpressió de la proteïna podia recuperar el fenotip disminuint el percentatge de vacuoles (Capdevila-Nortes et al., 2013). Per tant, es suggereix que el pas següent seria realitzar experiments de complementació en el model astrocítari del ratolí *knock-out* i estudiar si en aquest cas també es pot revertir el fenotip vacuolitzant. Durant la realització d'aquest treball no s'han pogut realitzar aquests experiments.

2. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ KNOCK-OUT

En altres estudis, mitjançant el cultiu primari d'astròcits de rata, s'havia observat que GlialCAM es trobava principalment localitzada en la membrana i en les unions astrocitàries, i en canvi, CIC-2, tot i ser una proteïna de membrana, es localitzava de manera intracel·lular (Jeworutzki et al., 2012).

S'havia observat que la proteïna GlialCAM mantenia la seva correcta localització a les unions astrocitàries en el model *knock-down* per MLC1 a diferència del que s'ha observat en el teixit de ratolí *knock-out*, en que GlialCAM es troba principalment deslocalitzada en la glia de Bergmann (Hoegg-Beiler et al., 2014).

El model d'astròcits de ratolí mostrava unes cèl·lules més desordenades que el cultiu primari de rata. A més, els anticossos dels quals es disposava en el laboratori donaven una marca de les proteïnes endògenes més difusa del que s'havia observat amb els astròcits de rata. Tot i així, mitjançant estudis d'immunofluorescència es va poder observar que GlialCAM es localitzava en les membranes astrocitàries tant en el cultiu *wild-type* com en el cultiu *knock-out* (Figura 54 A). Aquests resultats no reproduïen el que s'havia observat amb el teixit de ratolí *knock-out*, on la proteïna es mostrava deslocalitzada en la glia de Bergmann (Figura 44 A). Per altra banda, els estudis realitzats per a la proteïna CIC-2, mostraven una localització intracel·lular de la proteïna en ambdós cultius (Figura 54 A), tal com s'havia descrit anteriorment en astròcits de rata (Jeworutzki et al., 2012).

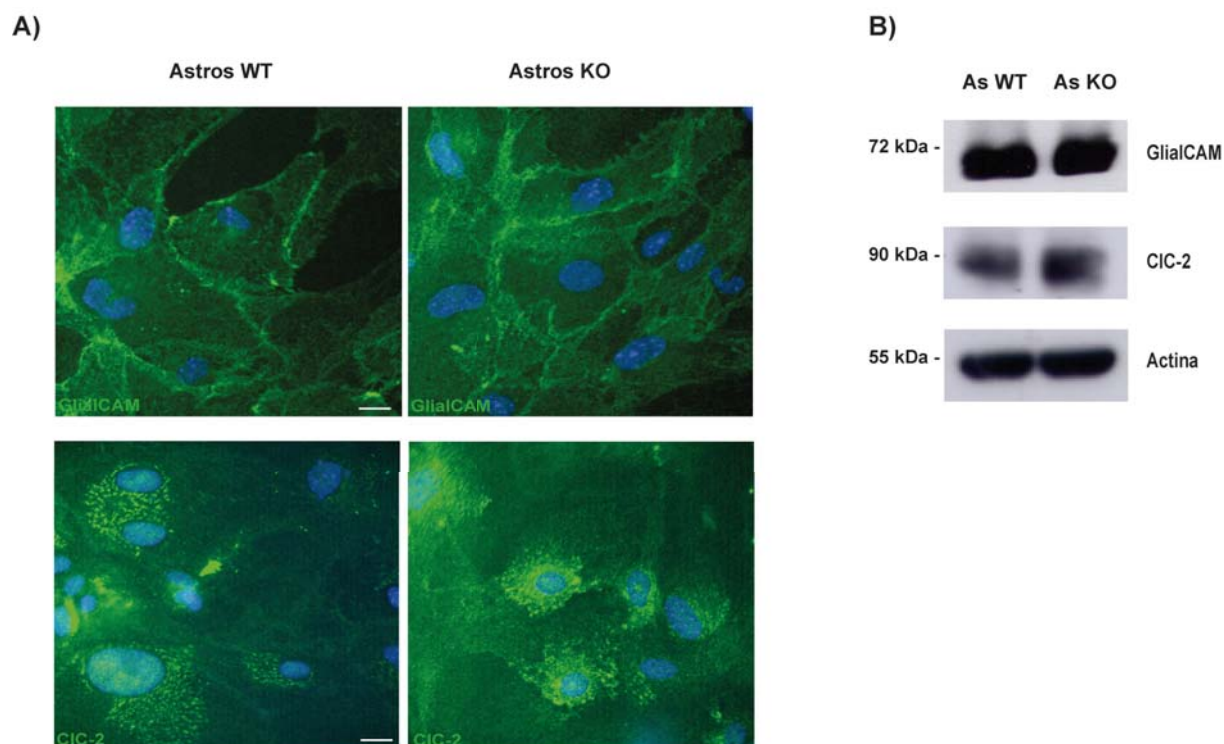


Figura 54. Anàlisi de les proteïnes GlialCAM i CIC-2 en els astròcits del ratolí *knock-out*. A) Estudi de la localització de les proteïnes GlialCAM i CIC-2 mitjançant immunofluorescències realitzades en el cultiu primari d'astròcits (Astros) de ratolí WT i del KO. B) Estudi de l'expressió de les proteïnes GlialCAM i CIC-2 mitjançant WB a partir d'extractes proteics d'astròcits (As) del ratolí WT i del KO. Dades corresponents a 6 experiments independents. Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal i CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

Paral·lelament es van realitzar estudis dels nivells d'expressió mitjançant WB en extractes obtinguts a partir d'astròcits *wild-type* i *knock-out*, i els resultats van mostrar que l'expressió de GlialCAM no es veia afectada per l'absència de MLC1 en aquestes cèl·lules (Figura 54 B). Els estudis dels nivells d'expressió per CIC-2 van demostrar que aquesta proteïna tampoc es veia afectada per la manca de MLC1 en els astròcits (Figura 54 B). Aquest resultat tampoc era l'esperat ja que en el cerebel de ratolí *knock-out* s'havia observat que aquesta proteïna presentava una disminució del 50% en els seus nivells d'expressió.

Així doncs, a partir d'aquests resultats van sorgir diverses preguntes. Per què els astròcits de la glia de Bergmann i els cultius primaris d'astròcits de ratolí *knock-out* presentaven resultats diferents? Quina és la condició necessària per a que GlialCAM i CIC-2 es trobin deslocalitzades? Les possibles respostes a aquestes preguntes es mostren al Capítol 3 dels resultats.

3. ANÀLISI D'ALTRES PROTEÏNES EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

De la mateixa manera que s'havia realitzat en el teixit de l'animal *knock-out*, es va decidir estudiar els nivells d'expressió i la localització d'altres proteïnes. En els cultius es van analitzar proteïnes típiques d'unió com són ZO-1, β -catenina o connexina-43. Altres proteïnes analitzades estàn relacionades amb el transport d'ions com el cotransportador de K^+ i Cl^- KCC1, NaKATPase i Kir 4.1.

Mitjançant estudis d'immunofluorescència es van estudiar les proteïnes d'unió ZO-1 (típica d'unions *tight*), β -catenina (típica d'unions adherents) i connexina-43 (típica d'unions *gap*). Els resultats van provar que no hi havia canvis en la localització d'aquestes proteïnes en els astròcits del *knock-out* respecte als astròcits del cultiu *wild-type* (figura 55 A). Totes es trobaven localitzades en els contactes astrocitaris. Alguns anticossos dels quals es disposava no van permetre estudiar la localització d'algunes proteïnes degut a l'inespecificitat.

Paral·lelament també es van realitzar estudis de WB a partir homogenats d'astròcits *knock-out* i tampoc es va observar cap canvi en els nivells d'expressió en les proteïnes típiques d'unions. Mitjançant aquesta tècnica també es va poder estudiar proteïnes relacionades amb el transport d'ions com són KCC1, NaKATPase i Kir 4.1. Aquestes tres proteïnes tampoc mostraven cap canvi en la seva expressió en el cultiu *knock-out* respecte al cultiu *wild-type* (figura 55 B). Algunes d'aquestes proteïnes s'havien estudiat anteriorment en el model *knock-down* per MLC1 on tampoc s'havia observat cap diferència d'expressió i localització (Duarri et al., 2011).

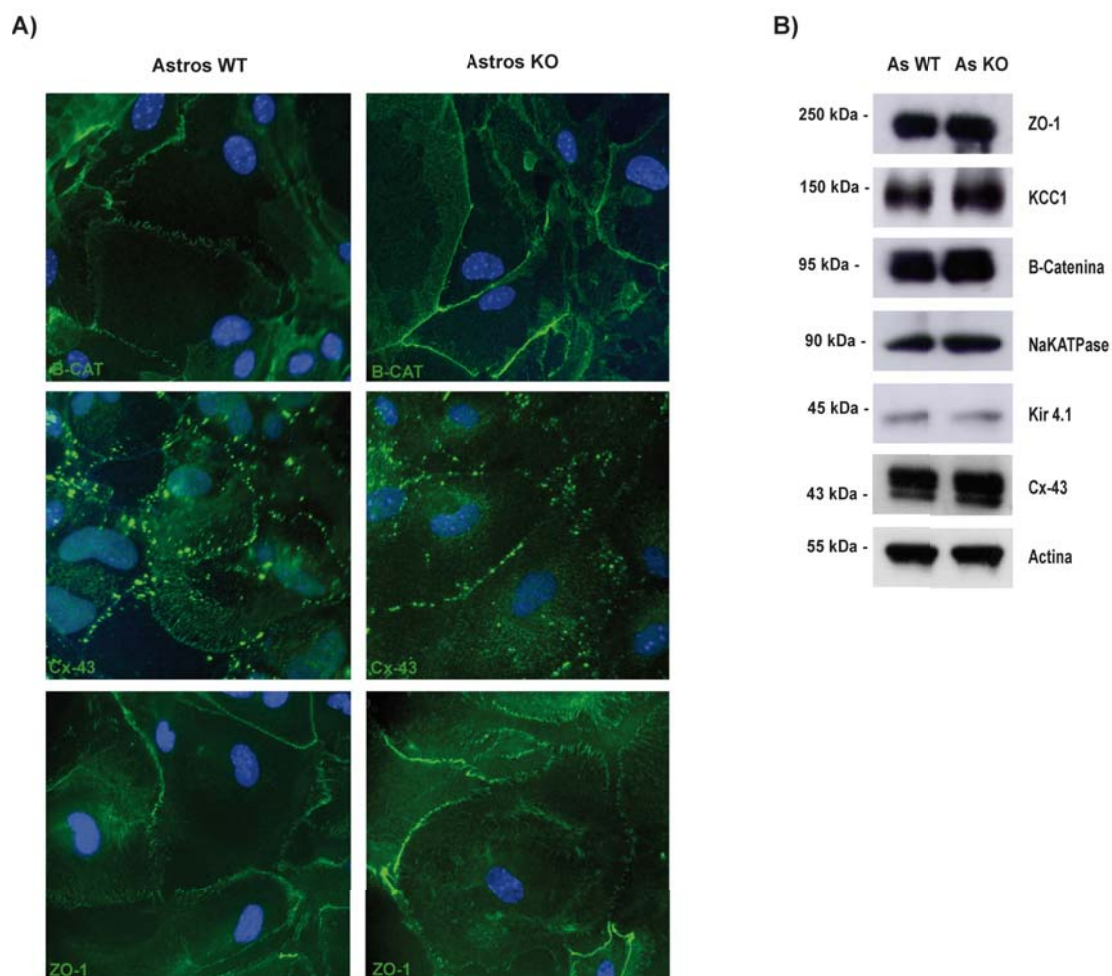


Figura 55. Anàlisi de marcadors proteics en astròcits de ratolí *knock-out*. A) Localització β -catenina, Cx-43 i ZO-1, utilitzant anticossos comercials, en astròcits (Astros) de ratolí WT i KO. B) Expressió de ZO-1, KCC1, β -catenina, NaKATPasa, Kir 4.1 i Cx43 analitzades per WB a partir d'extractes d'astròcits (As) WT i KO. Es mostra un experiment representatiu de la senyal de les proteïnes estudiades, Es detecten les proteïnes utilitzant anticossos comercials. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

4. ESTUDIS D'ELECTROFISIOLOGIA EN ELS ASTRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

El fenotip vacuolitzant que presentaven els pacients i els models cel·lulars *knock-down* per MLC1 i per GlialCAM relacionaven aquestes proteïnes amb un paper funcional en la regulació del volum dels astròcits. La manca de MLC1, en astròcits de rata o limfoblasts de pacients, i la manca de GlialCAM també s'havien relacionat amb la disminució de l'activitat VRAC (*Volume Regulated Anion Channel*) (Capdevila-Nortes et al., 2013; Ridder et al., 2011).

A partir del cultiu primari d'astròcits de ratolí *knock-out* es va realitzar un estudi funcional mitjançant la tècnica de *Patch Clamp* per corroborar si realment MLC1 podia tenir algun paper funcional o si realment estava relacionada d'alguna manera amb l'activitat VRAC. Aquests estudis electrofisiològics es van realitzar amb col·laboració amb el Dr. Stefano Ferroni (Universitat de Bolonia, Itàlia).

Es van analitzar corrents VRAC en astròcits de ratolí *wild-type* i *knock-out*. Per tal de poder estudiar l'activitat VRAC primerament es van bloquejar els canals de Na^+ i K^+ afegint-hi CsCl en el medi. En astròcits en cultiu l'activitat VRAC s'activa en condicions hipotòniques, generant un flux de Cl^- a través de la membrana.

Per poder comprovar que els registres presentaven activitat VRAC, es van inhibir les corrents amb un inhibidor específic com és el DCPIB. Així doncs, tal com es mostra en la figura 56 A, quan s'inhibien les corrents hi havia una inactivació instantània d'aquestes corrents.

Es van comparar les amplituds obtingudes en els registres i els resultats mostraven que l'activitat VRAC es trobava lleugerament disminuïda, de manera no significativa, en els astròcits del ratolí *knock-out* (Figura 56 B). Aquests resultats indicaven que MLC1 no era un component essencial de l'activitat VRAC però podria ser que MLC1 actués com a possible regulador de l'activitat VRAC mitjançant diferents vies.

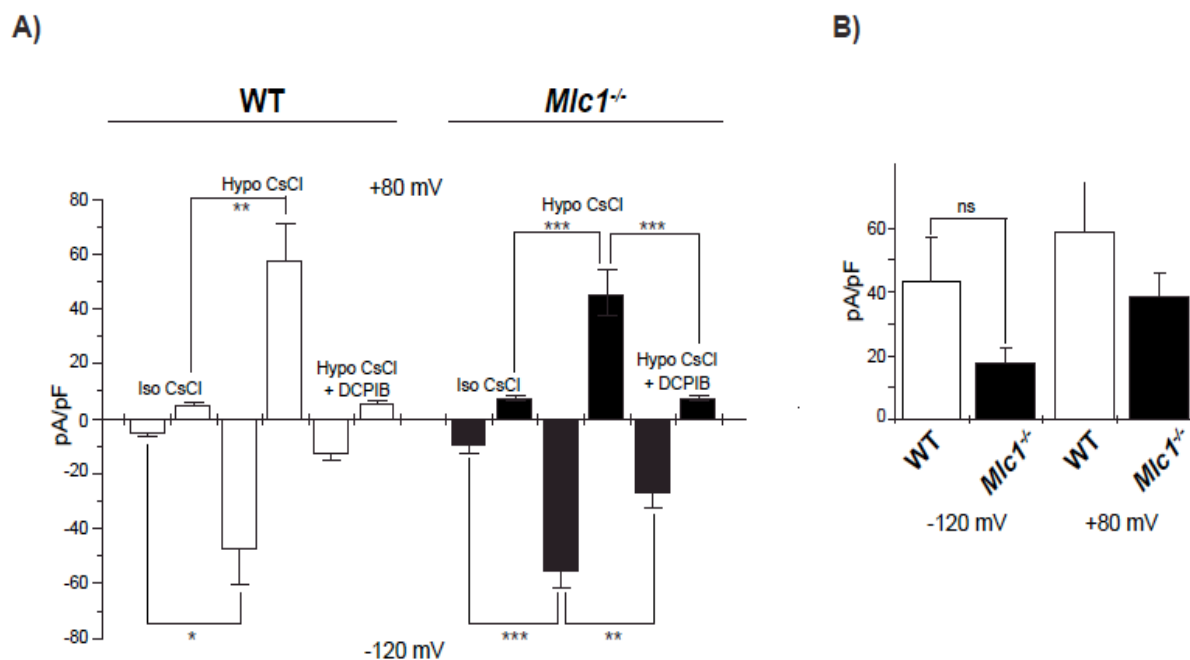


Figura 56. Mesura de l'activitat VRAC en astròcits de ratolí *knock-out*. A) Mesura del corrent a la membrana dels astròcits en condicions isotòniques (Iso CsCl), condicions hipotòniques (Hipo CsCl) i posterior addició de DCPIB en condicions hipotòniques (Hipo CsCl + DCPIB). Cèl·lules analitzades: WT n=9; KO n=17. B) Mesura de la densitat de corrent induïda amb DCPIB en condicions hipotòniques. Cèl·lules analitzades: WT n=7; KO n=7. WT:wild-type; KO:knock-out. Estadística: ns (no significatiu), * p<0,05,** p<0,01, *** p<0,001 *t*-Student aparellada.

CAPÍTOL 2.

CARACTERITZACIÓ I ESTUDI BIOQUÍMIC DEL CERVELL D'UN PACIENT AMB MLC

Fins al moment només s'havia pogut treballar a partir de biòpsies de pacients i amb models *in vitro*. Gràcies a la donació del cervell d'un pacient a la ciència s'ha pogut estudiar per primer cop l'afectació de la malaltia MLC en diferents regions del cervell.

En aquest capítol, d'una banda s'ha desenvolupat un estudi tissular, i de l'altra s'ha realitzat un estudi bioquímic *in vitro* de la mutació que presentava el pacient.

1. CARACTERITZACIÓ DE LA MOSTRA D'UN PACIENT

1.1 DADES CLÍNIQUES DE LA PACIENT

La pacient estudiada era una dona de 57 anys que desenvolupava el fenotip clàssic de la fisiopatologia MLC. Durant els primers mesos de vida va presentar macrocefàlia i posteriorment va desenvolupar deteriorament cognitiu, presència d'atacs epilèptics i deteriorament en les funcions motores (Figura 57 A).

De la mateixa manera que s'havia realitzat en altres pacients amb aquesta patologia, se li van realitzar estudis d'imatge mitjançant ressonància magnètica (MRI). Les imatges obtingudes evidenciaven una senyal difusa de la substància blanca a diferents regions, atròfia i presència de quists a la regió anterior-temporal (Figura 57 C).

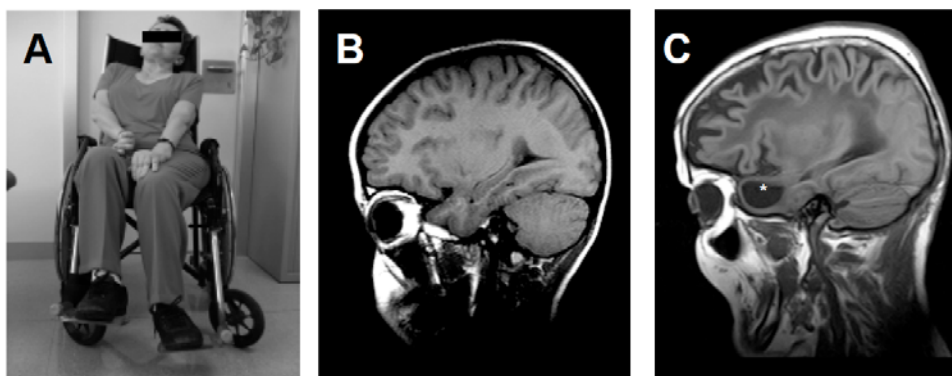


Figura 57. Fenotip de la pacient afectada per la MLC. A) Imatge de la pacient on s'observa que presentava deteriorament motor i atàxia. B) i C) Imatges de MRI on s'observa la presència de quists (asterisc), en la regió anterior-temporal del cervell de la pacient (C) respecte el control (B).

1.2 CARACTERITZACIÓ HISTOLÒGICA DE LA PACIENT

Mitjançant la col·laboració amb el Dr. Isidre Ferrer (UB-IDIBELL) es va examinar a fons el cervell de la pacient. El teixit presentava deteriorament de la substància blanca cerebral amb cavitats en els lòbuls frontal i parietal i presència de quists (Figura 58 A). De la mateixa manera que s'havia descrit anteriorment en altres pacients, estructures com són el cos callós, la càpsula interna, els nervis òptics, les fibres mielíniques i la comissura anterior no mostraven cap tipus de dany. També es podia apreciar pèrdua de mielina en la substància blanca del cervell (Figura 58 B).

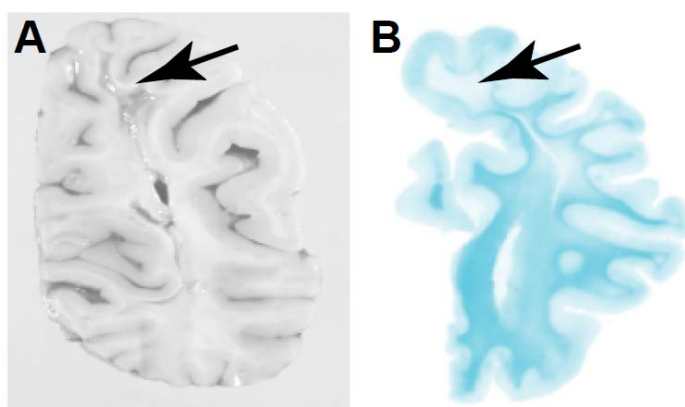


Figura 58. Histologia del cervell del pacient. A) Atròfia de la substància blanca cerebral i presència de quists (fletxa). B) Desmielinització en una regió de la substància blanca del cervell (fletxa) mitjançant la tinció de Klüver-Barrera.

La regió del cervell que presentava desmielinització es va estudiar microscòpicament de manera acurada. Es va observar que aquesta regió desmielinitzada presentava una menor quantitat d'astròcits i un alt nombre de cossos amilacis o *Corpora Amylacea* (Figura 59 A). Aquests cossos amilacis són inclusions associades a l'envelliment del cervell. Tot i que no es coneix el tipus cel·lular on s'originen, la funció i la formació d'aquests cossos encara no està del tot clara. Aquests cossos amilacis es veuen incrementats en situacions d'estrès o per situacions neuropatològiques com són l'epilèpsia, l'esquizofrènia, la malaltia d'Alzheimer i altres situacions neurodegeneratives (Cavanagh, 1999; Nishi et al., 2003).

De la mateixa manera als astròcits també s'observava pèrdua d'oligodendròcits en la regió desmielinitzada (Figura 59 B) i una conseqüent pèrdua d'axons neuronals (Figura 59 C).

Mitjançant estudis d'immunohistoquímica amb els anticossos contra GFAP, proteïna típica d'astròcits, i amb l'anticòs contra la proteïna α B-cristalina, proteïna d'estrès es va observar

que el teixit mostrava una clara pèrdua d'astròcits en aquesta regió (Figura 59 D) i una clara evidència que en aquesta regió algunes cèl·lules estaven patint cert estrès (Figura 59 E).

També es van realitzar estudis d'immunohistoquímica amb l'anticòs contra CD68 es va observar que hi havia infiltració d'alguns macròfags en la zona desmielinitzada però es va concloure que la infiltració de les cèl·lules del sistema immunitari en el teixit del pacient era lleu (Figura 59 F).

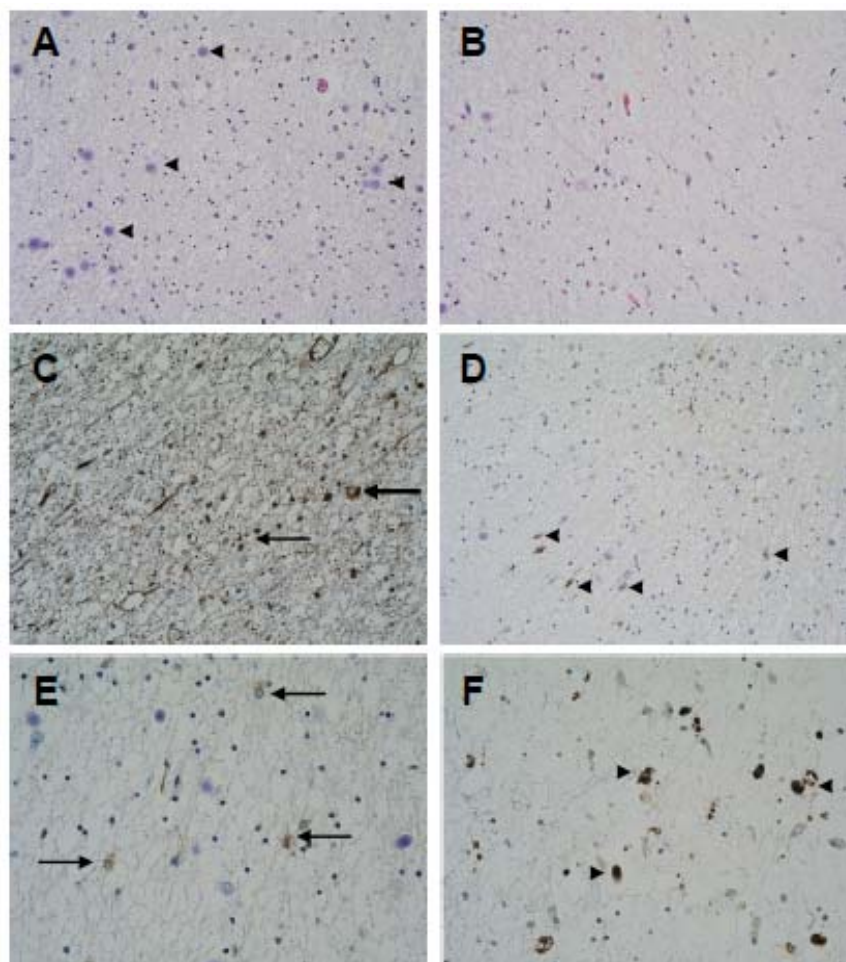


Figura 59. Examinació microscòpica de la regió desmielinitzada en el cervell de la pacient. A) Absència d'astròcits i presència d'un alt nombre de cossos amilacis (fletxes) en la perifèria de la substància blanca desmielinitzada. B) Pèrdua d'astròcits i d'oligodendròcits en la regió desmielinitzada. C) Absència d'axons i presència d'algunes protuberàncies axonals (fletxes) en una regió determinada sense mielina utilitzant l'anticòs contra RTC7. D) Absència d'astròcits observada utilitzant l'anticòs contra GFAP (fletxes). E) Presència d'algunes cèl·lules positives per la proteïna d'estrès α B-cristalina utilitzant un anticòs específic contra aquesta (fletxes). E) Infiltració moderada de macròfags en la regió desmielinitzada mitjançant l'utilització de l'anticòs contra CD68 (fletxes).

2. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DE LA MUTACIÓ PRESENTADA PER LA PACIENT: S69L

L'anàlisi del gen *MLC1* va determinar que la pacient era homozigot per la mutació c206C>T. La mutació provocava un canvi d'aminoàcid (una serina per una leucina) en la posició 69, S69L. Aquesta mutació es trobava localitzada en el primer pas transmembrana de la proteïna (Figura 60). Aquest canvi d'aminoàcid afectava a un residu que es troba altament conservat entre diferents espècies. S69L era una mutació que ja s'havia detectat en altres pacients de MLC indicant que es tractava d'una mutació patogènica.

Anteriorment en el grup s'havien estudiat, a nivell bioquímic i molecular, diferents mutacions en diferents sistemes heteròlegs com són els oòcits de *Xenopus* i les cèl·lules HeLa. Aquests estudis van demostrar que no totes les mutacions es comportaven de la mateixa manera en termes d'expressió i localització. Les mutacions es van classificar en lleus, intermèdies o severes, en funció dels seus nivells de proteïna a la membrana (Duarri et al., 2008).

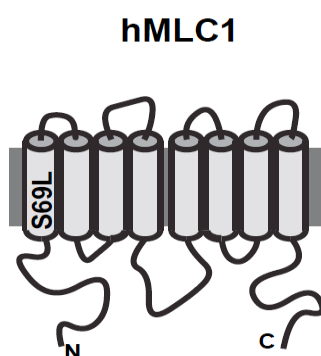


Figura 60. Predicció del model 2D de la proteïna hMLC1. La mutació S69L, presentada per la pacient, es localitza en el primer pas transmembrana de la proteïna.

De la mateixa manera que s'havia fet en les mutacions trobades anteriorment, es va fer un estudi de la mutació S69L a nivell bioquímic.

2.1 GENERACIÓ DEL MUTANT hMLC1S69L I ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MUTADA

Per tal de poder estudiar la mutació que presentava la pacient, es va inserir la mutació S69L a la seqüència humana de la proteïna. Aquest plàsmid incorporava 2 epítops HA; un localitzat a la part N-terminal i l'altre localitzat a l'últim *loop* extracel·lular. Aquest plàsmid va ser transfectat en cèl·lules HeLa per a realitzar els estudis de localització i dels nivells d'expressió de la mutació. En aquests experiments *in vitro* les proteïnes van ser anomenades de la següent manera: hMLC1wt i hMLC1S69L, per remarcar que es va utilitzar la variant humana de la proteïna.

Per observar millor si la localització de la mutació hMLC1S69L era específicament a la membrana plasmàtica, les cèl·lules es van contranfectar juntament amb la proteïna de membrana PH-GFP (domini homòleg de la plekstrina PLC δ 1 fusionat a GFP) (Figura 61).

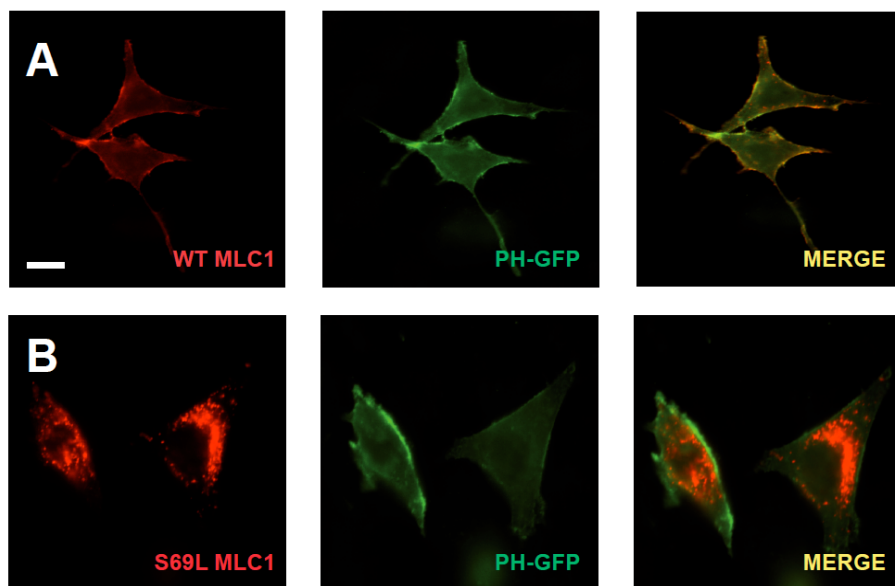


Figura 61. Estudi de la localització de hMLC1wt i hMLC1S69L en cèl·lules HeLa. A) Localització a la membrana plasmàtica de la proteïna hMLC1wt cotransfectada amb PH-GFP mitjançant immunofluorescència. B) Localització intracel·lular de la proteïna hMLC1S69L cotransfectada amb PH-GFP mitjançant immunofluorescència. Dades corresponents a 4 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (humà) contra la part N-terminal. Barra: 20 μ m.

A partir d'estudis d'immunofluorescència es va observar que la proteïna *wild-type* colocalitzava amb la PH-GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules (Figura 61 A). En canvi, la proteïna mutada, hMLC1S69L, es quedava parcialment retinguda de manera intracel·lular, incapaç d'arribar a la membrana plasmàtica (Figura 61 B). Aquests resultats eren similars als que s'havien obtingut anteriorment amb els estudis de localització realitzats amb les mutacions severes i intermitges (Duarri et al., 2008).

Després d'observar que la mutació quedava parcialment retinguda es va estudiar quin era el percentatge de proteïna mutada capaç d'arribar a la membrana plasmàtica. Prèviament en el grup s'havia descrit que els mutants de la proteïna MLC1 (amb excepció del mutant P92S) presentaven una reducció de la seva expressió a la membrana plasmàtica, quedant retinguts a l'interior cel·lular. De la mateixa manera que per aquests mutants, mitjançant d'experiments d'ELISA detectats per luminescència, es va estudiar la quantitat de proteïna mutada capaç d'arribar a la membrana (Figura 62).

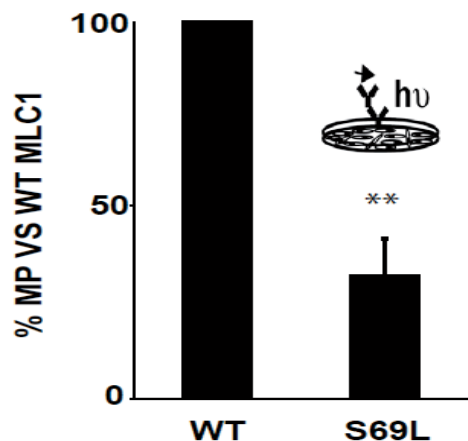


Figura 62. Estudi dels nivells de proteïna a la membrana plasmàtica de hMLC1S69L. Quantificació del percentatge de proteïna mutada que es troba localitzada a la membrana plasmàtica. Estudi realitzat a partir del mètode de luminescència. Dades corresponents a 3 experiments independents. Estadística : ** $p < 0,01$; *t*-Student no aparellada.

En el nostre grup de recerca s'havia descrit que la proteïna GlialCAM actuava com a subunitat β de MLC1 necessària per al correcte tràfic de MLC1 cap a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011a). Així doncs, es van realitzar estudis de colocalització entre GlialCAM-hMLC1wt i GlialCAM-hMLC1S69L per esbrinar si GlialCAM seria capaç de recuperar la localització de hMLC1.

Els resultats d'aquests experiments van mostrar que GlialCAM era capaç de portar a hMLC1wt a les unions cel·lulars (Figura 63 A). De la mateixa manera que amb la proteïna *wild-type*, quan GlialCAM és trobava cotransfectada amb la mutació hMLC1S69L, aquesta també era capaç de portar a la proteïna mutada a les unions cel·lulars (Figura 63 B).

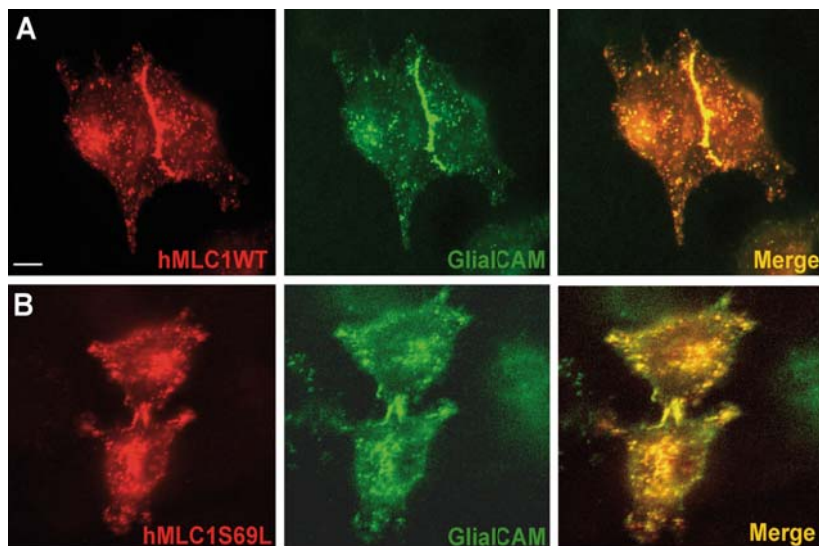


Figura 63. Estudi de localització de les proteïnes hMLC1wt i hMLC1S69L amb presència de GlialCAM en cèl·lules HeLa. A) Localització a les unions cel·lulars de la proteïna hMLC1wt cotransfectada amb GlialCAM. B) Localització a les unions cel·lulars de la proteïna hMLC1S69L cotransfectada amb GlialCAM. Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs 3F10 contra l'epítip HA i GlialCAM amb l'anticòs C2 contra la part C-terminal. Barra: 20 μm .

El fet d'observar que GlialCAM era capaç de treure del reticle endoplasmàtic a hMLC1S69L i dirigir-la a les unions cel·lulars, va fer replantejar si aquesta també seria capaç de millorar el tràfic cap a les unions d'altres mutacions descrites en el gen *MLC1* estudiades anteriorment. Així doncs, es van escollir unes quantes mutacions, algunes severes i altres no tan severes, per estudiar-ne el tràfic en presència de GlialCAM. Les mutacions que es mostren a continuació són: hMLC1G89S, hMLC1N141K, hMLC1P92S, hMLC1L311INS.

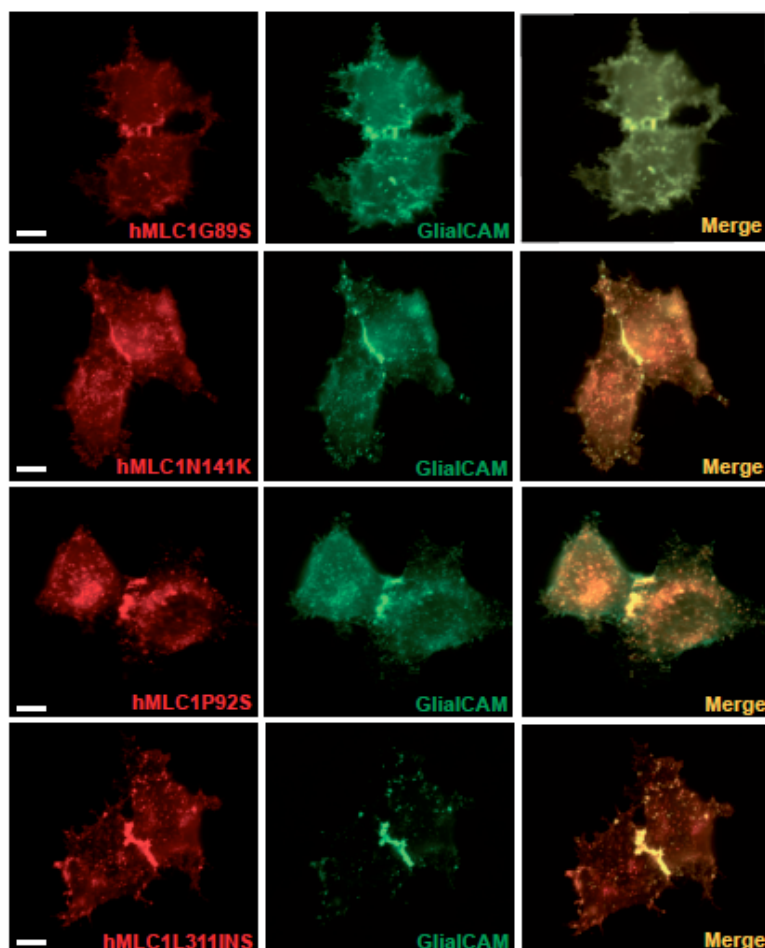


Figura 64. Estudi de la localització de diferents mutants de la proteïna hMLC1 amb presència de GlialCAM. Les mutacions estudiades són: hMLC1G89S, hMLC1N141K, hMLC1P92S, hMLC1L311Ins. La proteïna es troba concentrada a les unions cel·lulars en tots els casos. Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs 3F10 contra l'epítot HA i GlialCAM amb l'anticòs C2 contra la part C-terminal. Barra: 20 μ m.

Per a poder quantificar si realment les mutacions es concentraven a les unions cel·lulars es va calcular el guany d'intensitat de fluorescència a les unions ($R = \text{intensitat de fluorescència a la unió} / \text{mitja de l'intensitat de fluorescència a la membrana de la cèl·lula 1 i mitja de l'intensitat de fluorescència a la membrana de la cèl·lula 2}$). Aquest càlcul es va realitzar

mitjançant el programa *ImajeJ*, en que es traça una línia al llarg de les dues cèl·lules estudiades i s'obté un perfil d'intensitat

Els estudis de localització realitzats van determinar que GlialCAM que sí que era capaç de treure del reticle la proteïna hMLC1 quan aquesta es trobava mutada, millorant el seu tràfic i concentrant-la a les unions cel·lulars (Figura 64). Paral·lelament a aquest resultat es van estudiar les mutacions hMLC1P92S i hMLC1S246R en astròcits de rata juntament amb GlialCAM. De la mateixa manera que s'havia observat amb les cèl·lules HeLa, en els astròcits també s'observava una millora en el tràfic i en l'expressió de les mutacions quan aquestes es trobaven en presència de GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013).

2.2 ESTUDI DE L'ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA AMB LA MUTACIÓ S69L

Un altre punt important a estudiar era l'efecte que tenia la mutació sobre l'estabilitat de la proteïna i si GlialCAM podia afectar-la. Anteriorment en el grup ja s'havia determinat que altres mutacions afectaven l'estabilitat de la proteïna hMLC1, segons el seu grau de severitat (Duarri et al., 2008). Per a realitzar aquest experiment es va utilitzar un inhibidor de la síntesi proteica, la cicloheximida (CHX).

Les cèl·lules van ser transfectades amb hMLC1wt i hMLC1S69L amb o sense GlialCAM i van ser incubades durant 1, 3 i 6 hores amb la CHX a 37°C. El temps 0 correspon al grup de cèl·lules que no van ser tractades (Figura 65 A). A temps 0, quan la proteïna hMLC1S69L es trobava cotransfectada amb GlialCAM, s'observava una disminució de la seva expressió respecte la proteïna hMLC1wt. Quan les cèl·lules es tractaven amb la CHX és podia observar que l'estabilitat de la proteïna hMLC1S69L anava disminuint progressivament amb el temps indicant que la mutació aportava inestabilitat a la proteïna. En el cas de la proteïna hMLC1wt no hi havia cap tipus de disminució indicant que la proteïna en aquest cas es mantenia estable (Figura 65 A).

Mitjançant la quantificació dels nivells d'expressió obtinguts per WB, es va estudiar si el fet de cotransfectar la proteïna hMLC1S69L juntament amb GlialCAM, millorava l'estabilitat respecte a quan aquesta es trobava transfectada sola. Els resultats de la quantificació indicaven que l'estabilitat de la proteïna hMLC1wt sola i cotransfectada amb GlialCAM es mantenia. En canvi, els nivells d'expressió de la proteïna hMLC1S69L quan es trobava sola es veien disminuïts fins a obtenir només un 10%. El pic més gran de disminució dels nivells de proteïna s'observaven durant la primera hora d'incubació amb la CHX. Quan es va cotransfectar hMLC1S69L juntament amb GlialCAM s'observava que també hi havia una

disminució dels nivells de proteïna però en aquest cas només fins a un 40-30%. Aquest resultat estava indicant que GlialCAM podria ajudar a la millora de l'estabilitat de hMLC1S69L impedit que es degradés (Figura 65 B). Tot i així, els resultats no van ser estadísticament significatius.

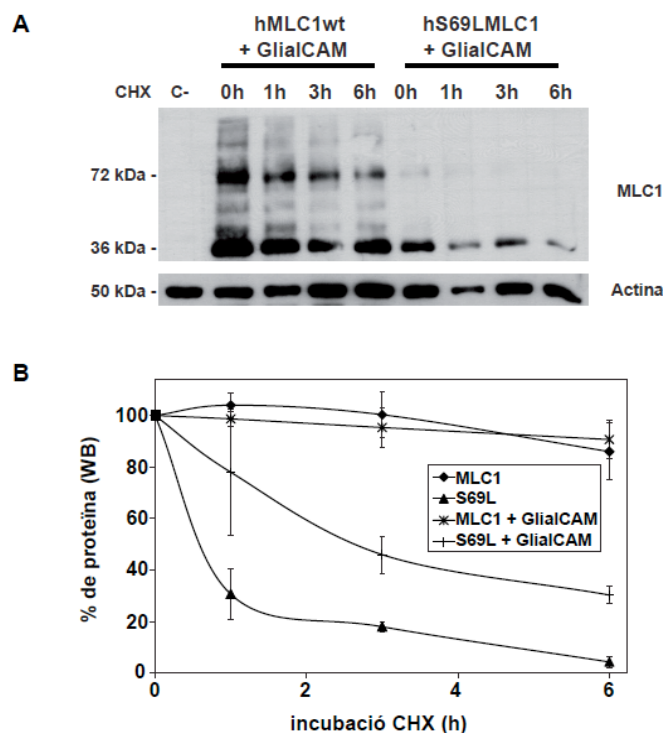


Figura 65. Estudi de l'estabilitat de la proteïna hMLC1S69L. A) Estudi de l'expressió mitjançant WB de hMLC1wt i hMLC1S69L cotransfectades amb GlialCAM i tractades durant 6 hores amb CHX (100µg/ml) B) Quantificació del percentatge de proteïna que es troba a la membrana plasmàtica, hMLC1wt i hMLC1S69L soles i cotransfectades amb GlialCAM. Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (humà) contra la part N-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Estadística: ns (no significatiu), *t*-Student.

3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MLC1 I GlialCAM EN EL TEIXIT DE LA PACIENT

Gràcies a la donació del cervell de la pacient es van poder realitzar diferents estudis per entendre millor la fisiopatologia de la malaltia MLC. Es van aconseguir mostres de diferents regions del cervell (cerebel, còrtex i hipocamp) de la pacient i es van utilitzar per a l'estudi de les dues proteïnes implicades en la malaltia: MLC1 i GlialCAM.

Els estudis de localització primerament es van realitzar en el còrtex. Es va observar que la proteïna MLC1 en el teixit control es localitzava en els astròcits situats al voltant dels vasos sanguinis. En el cas del teixit de la pacient es podia observar que hi havia absència de la

proteïna MLC1. Per altra banda, la proteïna GlialCAM es detectava tant en el teixit control com en el teixit de la pacient. La proteïna es trobava localitzada en els astròcits al voltant dels vasos sanguinis (Figura 66 A).

Els estudis dels nivells d'expressió d'aquestes dues proteïnes es van realitzar en còrtex, cerebel i hipocamp de la pacient i paral·lelament es van utilitzar els mateixos teixits d'un control. Es va observar l'absència de la proteïna MLC1 en els teixits de la pacient. A diferència del que s'observava en sistemes heteròlegs, com són les línies cel·lulars, en el teixit de la pacient la mutació S69L implicava la pèrdua total de la proteïna.

La proteïna GlialCAM, en canvi, sí que hi era present però amb una certa disminució dels seus nivells respecte el control (40%). Tot i així, no es podia concloure que aquesta disminució fos del tot fiable, ja que el temps *post-mortem* del teixit de la pacient va ser més llarg de l'esperat i podria ser que aquest no es trobés en les condicions més òptimes (Figura 66 B).

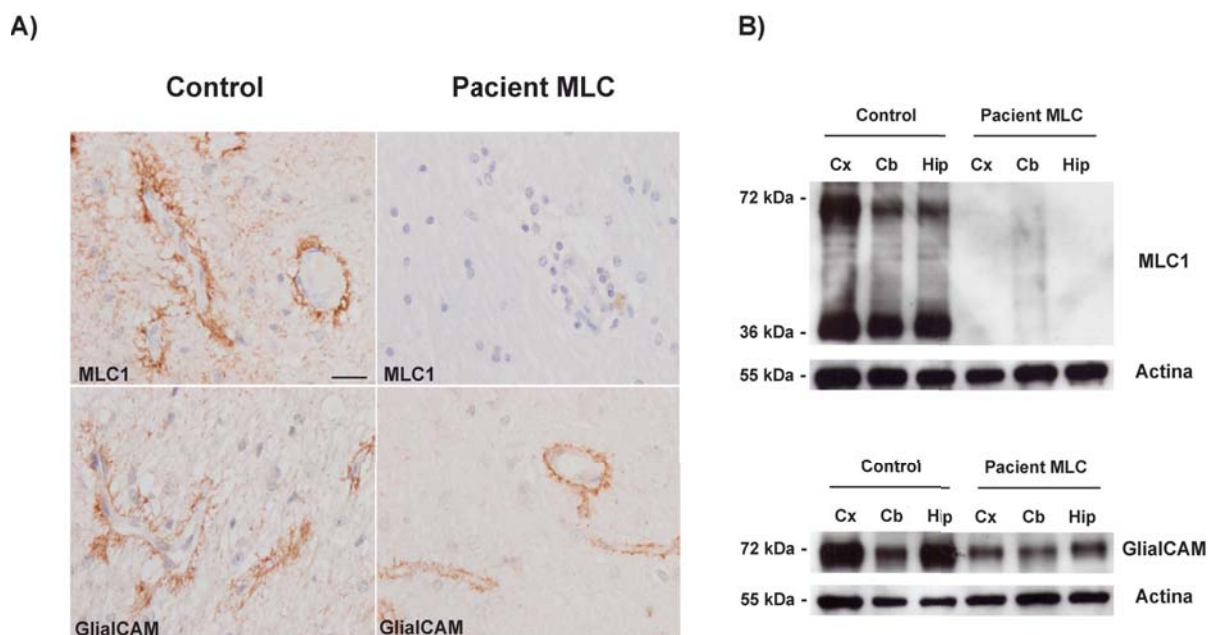


Figura 66. Anàlisi de les proteïnes MLC1 i GlialCAM en el teixit de la pacient afectada per la MLC. A) Localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM a partir d'immunohistoquímica en DAB en el còrtex de la pacient amb MLC i d'un teixit control. B) Expressió de les proteïnes MLC1 i GlialCAM mitjançant WB en teixit de la pacient i d'un teixit control a partir d'extractes de membrana de còrtex, cerebel i hipocamp. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (humà) contra la part N-terminal i GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Cx:còrtex; Cb:cerebel; Hip:hipocamp. Barra: 40 μ m.

3.1 REEXAMINACIÓ DEL TEIXIT DE LA PACIENT

Els estudis de localització realitzats amb el model de ratolí *knock-out* per *Mlc1*, mostraven que la proteïna GlialCAM es trobava deslocalitzada en el cerebel (Capítol 1 de resultats). Per aquesta raó, quan es van obtenir aquests resultats en el teixit del ratolí *knock-out* es va recuperar el teixit de la pacient i es van refer els estudis de la localització de GlialCAM. Aquest cop els estudis de localització es van realitzar en el cerebel.

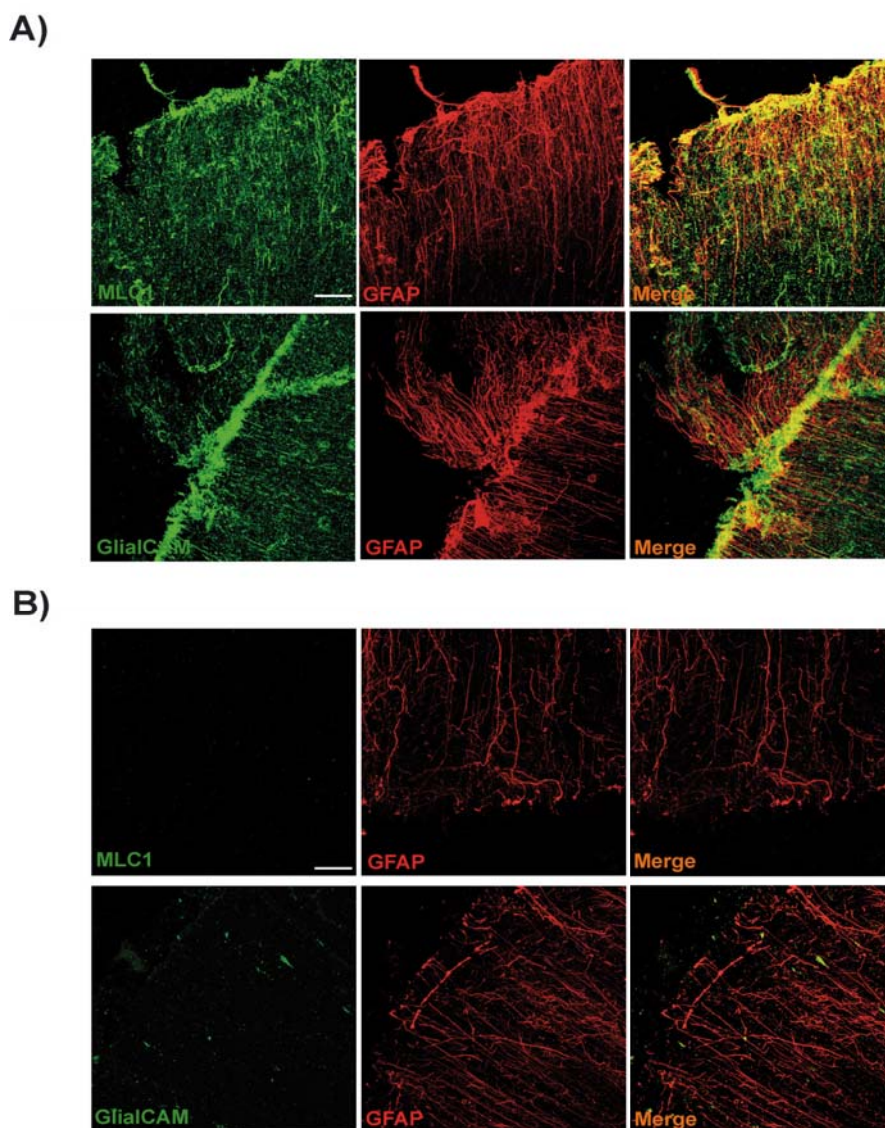


Figura 67. Anàlisi de les proteïnes MLC1 i GlialCAM en el cerebel de la pacient. A) Estudi de la localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM a partir d'immunofluorescència de doble marcatge amb GFAP en el cerebel control. B) Estudi de localització de MLC1 i GlialCAM a partir d'immunofluorescència de doble marcatge amb GFAP en el cerebel de la pacient. S'observa la proteïna MLC1 absent i la proteïna GlialCAM deslocalitzada. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (humà) contra la part N-terminal, GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal i GFAP amb un anticòs comercial. Barra: 40 μ m.

Mitjançant estudis d'immunofluorescència en el cerebel d'un control es va observar que MLC1 i GlialCAM es trobaven perfectament localitzades en els processos apicals de la glia de Bergmann (Figura 67 A). Paral·lelament es van realitzar estudis de localització en el cerebel de la pacient. Aquests resultats demostraven que en aquesta cas també hi havia una deslocalització per part de GlialCAM en aquesta regió, de la mateixa manera que s'havia observat anteriorment en el teixit de ratolí *knock-out* (Figura 67 B). En aquest experiment també es van realitzar dobles marcatges amb GFAP per tal de verificar que la deslocalització era específica dels astròcits que es troben en aquesta regió.

4. ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2 EN EL TEIXIT DE LA PACIENT

En el Capítol 1 de resultats s'explicava que CIC-2 podria jugar un paper important en la fisiopatologia de MLC, ja que aquesta proteïna, igual que GlialCAM, es trobava deslocalitzada en la glia de Bergmann del ratolí *knock-out*, i presentava uns nivells d'expressió disminuïts un 50% en aquest mateix teixit.

Anteriorment s'havien intentat realitzar estudis de localització en el teixit humà però l'anticòs de CIC-2 del qual es disposava en aquell moment no era del tot específic per la tècnica d'immunofluorescència i no detectava la proteïna per WB. Per aquesta raó es va generar un nou anticòs contra la part C-terminal de CIC-2. Aquest nou anticòs va ser purificat i testat per la companya de laboratori Tanit Arnedo.

Per tant, de la mateixa manera que es va fer per a la proteïna GlialCAM, quan es va obtenir el nou anticòs contra CIC-2 es va tornar a examinar el teixit de la pacient per saber si també hi podia haver canvis en els nivells d'expressió i en la localització de CIC-2.

Els resultats dels estudis de localització no eren del tot clars ja que com s'ha explicat abans, el teixit possiblement no es trobava en les millors condicions. Semblava que en el teixit de la pacient hi havia una certa deslocalització per part de la proteïna CIC-2, principalment en la substància blanca i en els processos de la glia de Bergmann (fletxes), respecte el teixit control (Figura 68 A). A banda, els estudis de WB senyalaven que la proteïna es trobava disminuïda gairebé al 100% (Figura 68 B). Faria falta examinar de nou un altre pacient per tal de verificar els resultats obtinguts ja que de moment els estudis per la proteïna CIC-2 generen dubtes.

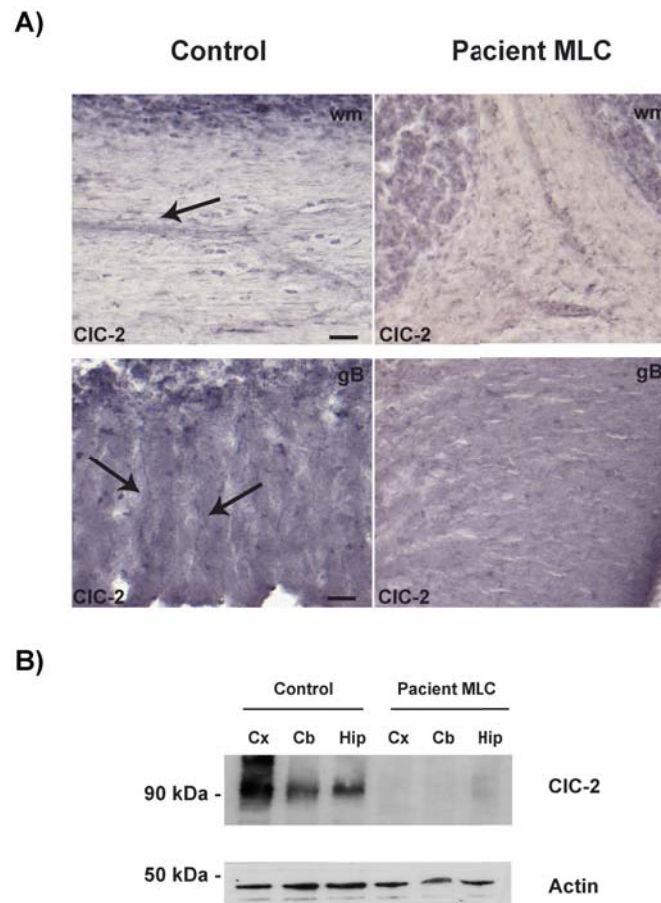


Figura 68. Anàlisi de la proteïna CIC-2 en el teixit de la pacient. A) Estudi de la localització a partir de la tècnica immunohistoquímica DAB de CIC-2 en la substància blanca i en la glia de Bergmann del cerebel en el teixit control (fletxes) i en el teixit de la pacient. B) Estudi de l'expressió mitjançant WB de CIC-2 en diferents regions del cervell del teixit control i del teixit de la pacient. Es detecta CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Cx:còrtex; Hip: Hipocamp; Cb:cerebel; wm: white matter (substància blanca); gB: glia de Bergmann. Barra: 40 μ m.

CAPÍTOL 3.

UTILITZACIÓ I GENERACIÓ DE MODELS CEL·LULARS PER A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ FISIOLÒGICA ENTRE GliaICAM I CIC-2

Estudis de proteòmica realitzats en col·laboració amb l'empresa *Logopharm* van mostrar que CIC-2 estava associada a l'interactoma de GlialCAM, juntament amb MLC1 (Jeworutzki et al., 2012). Diferents estudis d'immunoprecipitacions (tant en cèl·lules HeLa com en cervells de ratolí), d'interacció a partir del mètode *Split-TEV* (Capdevila-Nortes et al., 2012) i estudis de localització van demostrar que GlialCAM i CIC-2 interaccionaven directament (Jeworutzki et al., 2012). Paral·lelament a aquests estudis també es van realitzar experiments d'electrofisiologia, en oòcits de *Xenopus*, cèl·lules HeLa i astròcits de rata, que indicaven que la sobreexpressió de GlialCAM incrementava les corrents a través del canal CIC-2, canviant les seves propietats d'activació i la seva rectificació, permeten més flux de Cl⁻ a potencials positius (Jeworutzki et al., 2012).

Les cèl·lules gials tenen una elevada permeabilitat als ions de K⁺ i un potencial de membrana que es despolaritza quan hi ha una alta activitat neuronal. S'hipotetitza que la relació fisiològica entre GlialCAM i CIC-2 podria tenir un paper important amb l'homeòstasi de les cèl·lules juntament amb altres proteïnes transmembrana (AQP4, Kir 4.1, Cx43, GLT-1...) regulant el transport d'ions, osmòlits orgànics i aigua.

Aquest capítol s'ha dividit en dues parts: la primera és l'estudi de l'efecte del K⁺ sobre les proteïnes GlialCAM i CIC-2, i la segona és el desenvolupament d'un nou model cel·lular, el cultiu primari d'oligodendròcits, per a l'estudi de la relació fisiològica entre GlialCAM i CIC-2.

PART 1: EFECTE DEL K⁺ SOBRE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN ASTRÒCITS DE RATA I RATOLÍ

1. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM, MLC1 i CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺ EN ASTRÒCITS DE RATA

1.1 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA GlialCAM

Estudis preliminars de *time course* realitzats per la Dra. Tania López, antiga membre del grup, en astròcits de rata incubats en un medi amb una concentració de K⁺ de 60mM entre 1 i 6 hores, semblaven provocar un canvi en la localització de GlialCAM. Per tant, primerament es va intentar reproduir aquests resultats observats. Es va realitzar el mateix experiment que s'havia fet anteriorment. Astròcits diferenciats durant 3 setmanes amb AraC se'ls va canviar el medi DMEM, a un grup de cèl·lules se'ls va posar medi fisiològic i a un altre grup se'ls va posar un medi amb alt contingut de K⁺. Transcorregut el temps necessari (6 hores) es va analitzar la localització de GlialCAM mitjançant estudis d'immunofluorescència.

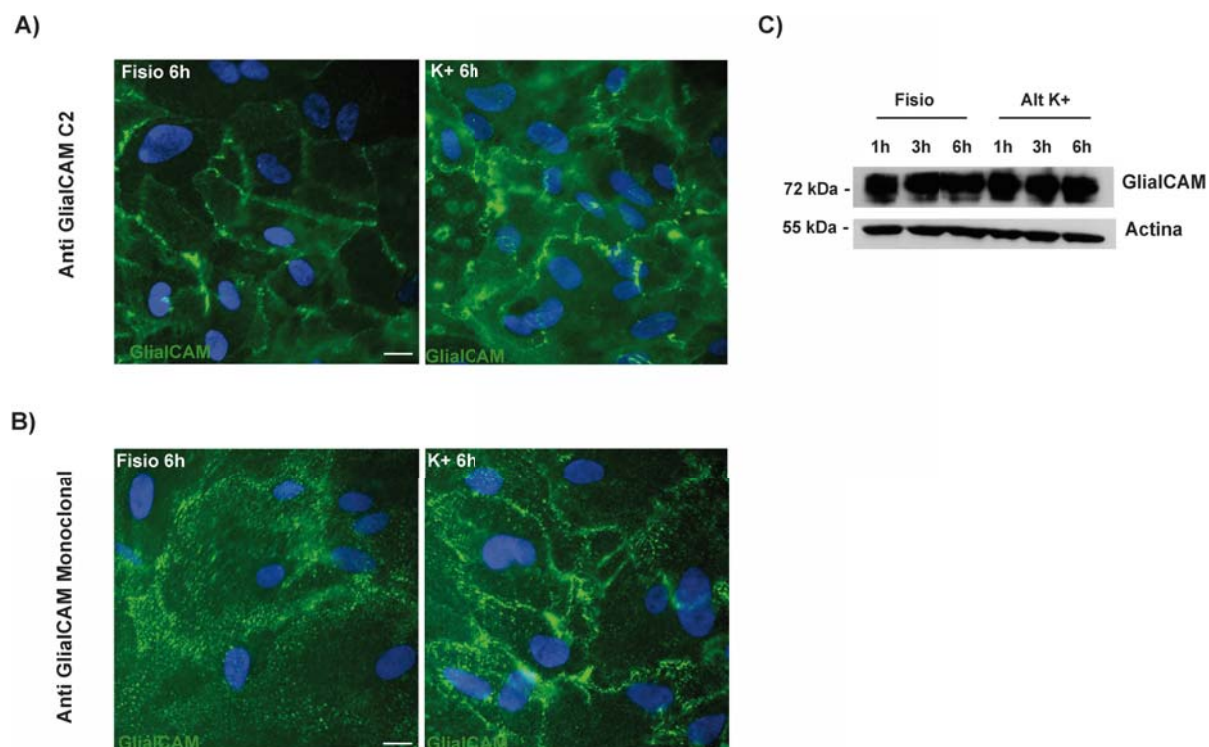


Figura 69 Anàlisi de la proteïna GlialCAM en astròcits de rata tractats amb un medi amb alt contingut de K^+ . A) Localització de GlialCAM en astròcits de rata tractats amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. S'utilitza l'anticòs policlonal GlialC2 contra una part del C-terminal de la proteïna. B) Localització de GlialCAM en astròcits de rata tractats amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. S'utilitza l'anticòs comercial monoclonal contra una regió de la part extracel·lular de la proteïna. C) Expressió de la proteïna GlialCAM mitjançant WB a diferents temps d'incubació (1h, 3h, 6h) dels astròcits amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ . Dades corresponents a 5 experiments independents. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Fisio: medi fisiològic; K^+ : medi amb alt contingut de K^+ . Barra: 20 μ m.

Es va estudiar la localització de la proteïna GlialCAM en astròcits que havien estat tractats durant 6 hores amb medi fisiològic o medi amb alt contingut de K^+ . De la mateixa manera que s'havia fet anteriorment, es va detectar GlialCAM amb dos anticossos diferents (Figura 69 A i B). En ambdós casos les imatges i el tractament d'aquestes es van realitzar en les mateixes condicions d'intensitat (mateix *exposure time* en el microscopi).

Es va fer una immunofluorescència permeabilitzant en la que es va detectar GlialCAM amb un anticòs policlonal contra un pèptid de la part C-terminal de la proteïna. En aquest experiment es va observar que els astròcits tractats amb un medi amb alt contingut de K^+ semblaven presentar una marca més intensa de GlialCAM a les membranes cel·lulars a diferència del astròcits tractats amb medi fisiològic (Figura 69 A).

Paral·lelament es van realitzar estudis de localització emprant la tècnica d'immunofluorescència no permeabilitzant utilitzant un anticòs monoclonal contra una part de la regió extracel·lular de GlialCAM. Aquest anticòs mostrava una marca més difusa de la proteïna en condicions fisiològiques. En aquest cas, també es va observar que els astròcits tractats amb el medi amb alt contingut de K^+ semblaven mostrar una marca més intensa de GlialCAM a les membranes cel·lulars. Es formaven contactes entre els astròcits respecte els que havien estat tractats amb medi fisiològic (Figura 69 B).

Es van intentar quantificar les membranes dels astròcits per tal de verificar si realment hi havia un efecte del K^+ però no es va aconseguir extreure cap conclusió estadísticament significativa, ja que GlialCAM és una proteïna que en condicions normals ja es troba localitzada a les membranes cel·lulars.

Mitjançant estudis de WB es van examinar els nivells d'expressió de la proteïna en les diferents condicions. Els resultats van determinar que el fet que els astròcits es trobessin en un medi amb més K^+ no feia variar els nivells d'expressió GlialCAM (Figura 69 C).

1.2 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA MLC1

De la mateixa manera que s'havia fet per a GlialCAM, es va estudiar la localització de MLC1 en els astròcits de rata després de ser tractats amb medi fisiològic o amb medi amb alt contingut de K^+ .

Els estudis de localització fets per MLC1 van mostrar que, les cèl·lules que havien estat tractades amb el medi que contenia un alt contingut de K^+ , també semblaven mostrar una major intensitat de fluorescència de la proteïna localitzada a les membranes cel·lulars (Figura 70 A). Tot i així, MLC1 també es localitza a la membrana en condicions fisiològiques i per tant tampoc es podia concloure que realment el K^+ tingués efecte en aquest cas.

Els WB realitzats en les mateixes cèl·lules van determinar que, de la mateixa manera que GlialCAM, els nivells d'expressió no variaven quan els astròcits tractats amb el medi amb alta concentració de K^+ (Figura 70 B).

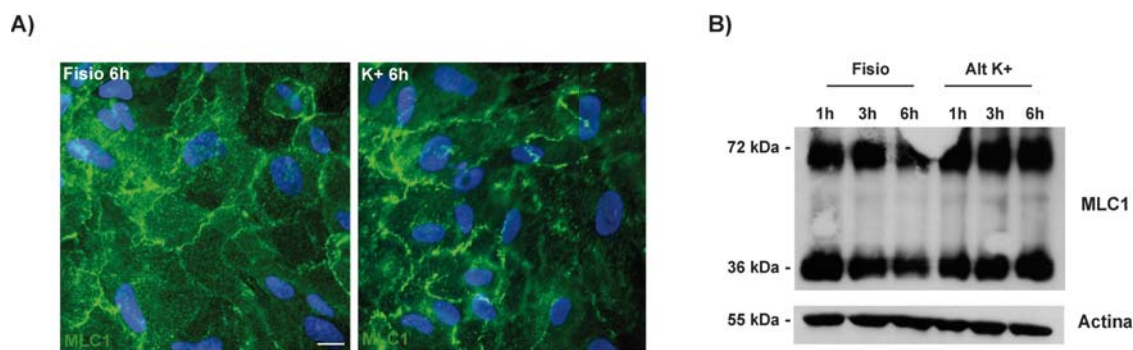


Figura 70. Anàlisi de la proteïna MLC1 en astròcits de rata tractats amb un medi amb alt contingut de K⁺. A) Localització de MLC1 en astròcits de rata tractats amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K⁺ durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. B) Expressió de la proteïna MLC1 mitjançant WB a diferents temps d'incubació (1h, 3h, 6h) dels astròcits amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K⁺. Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Físio: medi fisiològic; K⁺: medi amb alt contingut de K⁺. Barra: 20 µm.

1.3 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2

El següent pas era estudiar la localització de CIC-2 en les mateixes condicions que s'havia fet per a GlialCAM i MLC1. Anteriorment s'havien intentat realitzar aquests experiments però l'anticòs contra la proteïna CIC-2 del qual es disposava no era del tot específic i era difícil detectar-la. Posteriorment es van poder realitzar aquests experiments gràcies a la generació del nou anticòs contra CIC-2.

De la mateixa manera que per a GlialCAM i MLC1, un grup d'astròcits es va tractar durant 6 hores amb medi fisiològic i un altre amb medi amb alt contingut de K⁺. Es van realitzar estudis de localització mitjançant immunofluorescència i, en aquest cas, els resultats indicaven que CIC-2 era capaç de localitzar-se a les membranes d'alguns astròcits quan aquests havien estat incubats amb el medi amb alt contingut de K⁺ (Figura 71 A).

Com que la marca de CIC-2 endògena era una mica difusa es va pensar en sobreexpressar la proteïna en els astròcits a partir d'un adenovirus desenvolupat anteriorment en el laboratori. L'adenovirus utilitzat portava incorporat un epítot Flag. Aquests adenovirus de sobreexpressió es van infectar 48 hores abans de realitzar l'experiment. Passat el temps necessari perquè les cèl·lules haguessin sobreexpressat la proteïna, es van tractar de la mateixa manera que s'havia fet en els casos anteriors (6 hores amb medi fisiològic i amb medi amb alt contingut de K⁺). Així doncs, de la mateixa manera que la proteïna endògena, quan es sobreexpressava CIC-2 i es detectava amb l'anticòs contra Flag també s'observava

que aquesta era capaç de concentrar-se en algunes unions astrocitàries en presència d'una major quantitat de K^+ extracel·lular (Figura 71 B).

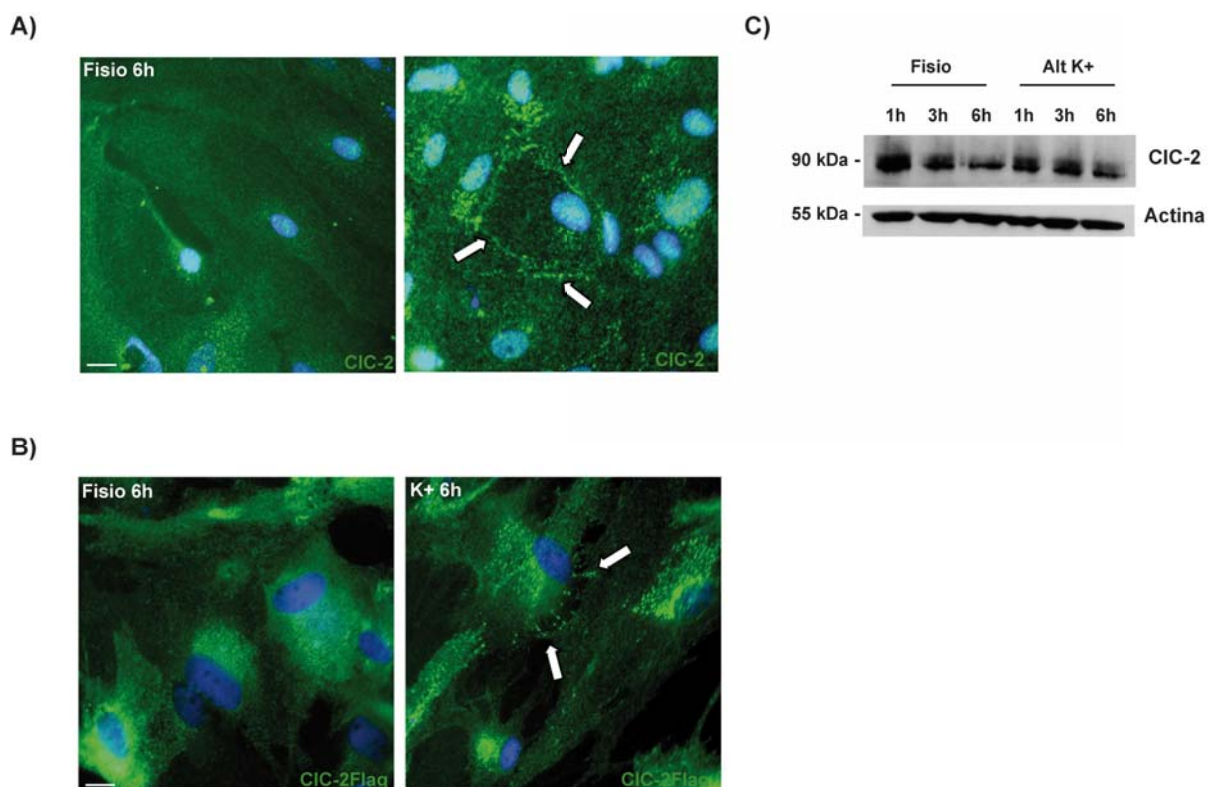


Figura 71. Anàlisi de la proteïna CIC-2 en astròcits de rata tractats amb un medi amb alt contingut de K^+ . A) Localització de CIC-2 en astròcits de rata tractats amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. Es detecta la proteïna amb l'anticòs Ct contra CIC-2. B) Localització de CIC-2 en astròcits de rata infectats amb virus de sobreexpressió CIC-2 Flag tractats amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. Es detecta la proteïna amb l'anticòs contra Flag. C) Expressió de la proteïna CIC-2 mitjançant WB a diferents temps d'incubació (1h, 3h, 6h) dels astròcits amb medi fisiològic i medi amb alt contingut de K^+ . Dades corresponents a 4 experiments independents. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. Fisio: medi fisiològic; K^+ : medi amb alt contingut de K^+ . Barra : 20 μm .

Aquests resultats indicaven que una alta concentració de K^+ tenia un efecte sobre CIC-2 i que aquesta condició era necessària per a la localització de la proteïna a les unions astrocitàries.

Per WB es van examinar els nivells d'expressió de la proteïna CIC-2 i es va determinar que l'alt contingut de K^+ extracel·lular tampoc feia variar els nivells d'expressió d'aquesta proteïna (Figura 71 C).

2. ESTUDIS ELECTROFISIOLÒGICS DE GlialCAM I CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺

Els estudis electrofisiològics que es mostren a continuació es van realitzar amb col·laboració amb el Dr. Xavier Gasull (UB-IDIBAPS) mitjançant la tècnica de *Patch-Clamp*.

Per a realitzar aquests registres els astròcits es van tractar amb diBAMPC enlloc de AraC (condició utilitzada normalment per a la diferenciació). Havien de ser aquestes les condicions ja que els astròcits que creixen en cultiu són cèl·lules poligonals una mica aixafades i, per tant, difícil de registrar-les mitjançant aquesta tècnica. Quan les cèl·lules es tracten amb diBAMPC, canvien la seva morfologia transformant-se a cèl·lules amb forma més estrellada amb el cos més arrodonit facilitant el registre. A més a més, ja estava descrit que en aquestes condicions els astròcits expressaven el canal de Cl⁻ CIC-2 (Ferroni et al., 1997).

A partir de cultius primaris d'astròcits, incubats amb un medi fisiològic o amb un medi amb alt contingut de K⁺, es van analitzar les corrents del canal CIC-2. Els astròcits control, és a dir les que s'havien tractat prèviament amb medi fisiològic, mostraven la típiques traces a potencials negatius de les corrents de Cl⁻ mediades pel canal CIC-2. Les corrents de Cl⁻ registrades en els astròcits tractats amb el medi amb alt contingut de K⁺, en canvi, mostraven un canvi de comportament, donant lloc a unes traces molt similars a les que s'obtenia quan es sobreexpressava la proteïna GlialCAM (Figura 72 A). En aquestes corrents també va observar que el canal s'activava a potencials positius. En condicions d'alt contingut de K⁺, les corrents incrementaven i presentaven una menor rectificació (Figura 72 B).

Aquests resultats juntament amb els de l'estudi de localització indicaven que una alta concentració de K⁺ era l'estímul necessari per a què CIC-2 es localitzés a les membranes astrocitàries i canviés les seves propietats de canal. Per tant, podria ser que GlialCAM es trobés més concentrat a les membranes cel·lulars en aquestes condicions i conseqüentment portés també a CIC-2 a localitzar-se a les membranes.

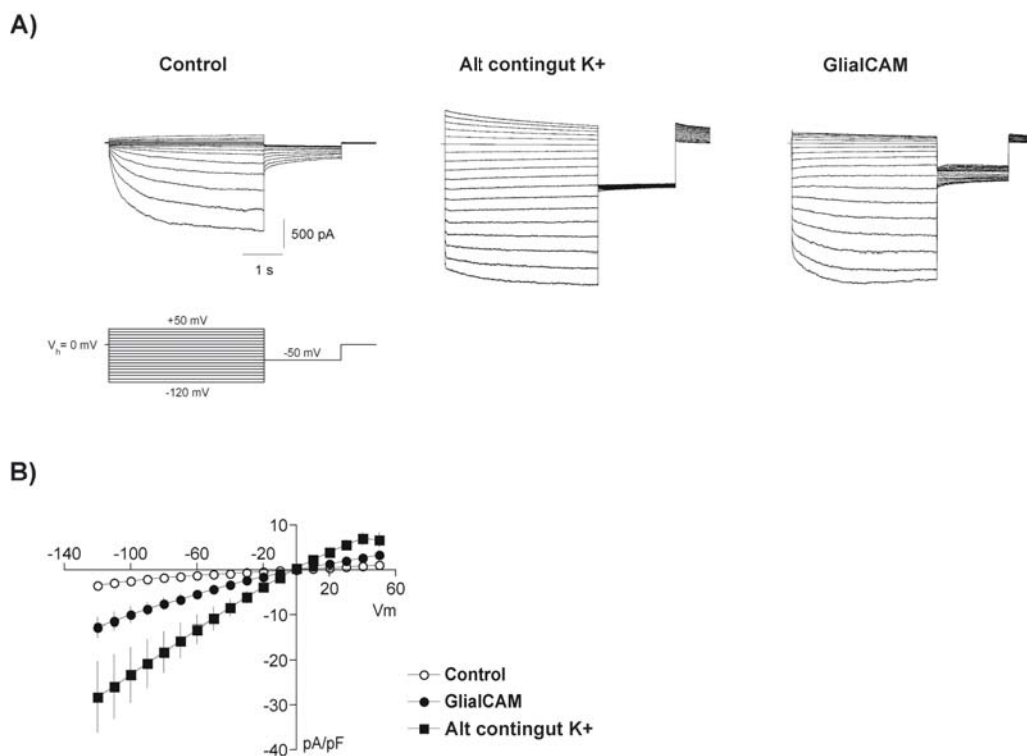


Figura 72. Mesura de l'activitat CIC-2 en astròcits de rata tractats amb un medi amb alt contingut de K⁺. A) Registres representatius de les corrents de clorur detectades en astròcits de rata tractats amb diBAMPc. S'observen les traces típiques de les corrents de clorur a través del canal CIC-2 sense cap estímul, en alt contingut de K⁺ i amb una sobreexpressió de GlialCAM. Cèl·lules analitzades per grup n=10. B) Relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady state*).

3. ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM I CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺ EN ASTRÒCITS DEL RATOLÍ *KNOCK-OUT*

El fet de veure que els astròcits de rata tractats amb alt contingut de K⁺ semblaven mostrar una major concentració de GlialCAM a la membrana cel·lular i que això implicava que CIC-2 també fos capaç de localitzar-se a les membranes d'alguns astròcits, van fer plantejar algunes preguntes respecte els resultats obtinguts amb els astròcits del *knock-out* per *Mlc1*.

Per què la proteïna GlialCAM es trobava deslocalitzada només en algunes regions del cervell? Per què aquesta deslocalització no s'observava en el cultiu primari d'astròcits del *knock-out*? Aquesta deslocalització depenia d'alguna condició concreta? En base a aquestes preguntes es va pensar en realitzar el mateix tipus d'experiments en el cultiu primari d'astròcits del *knock-out* aplicant l'estímul del K⁺.

4.1 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM EN ELS ASTRÒCITS DEL *KNOCK-OUT*

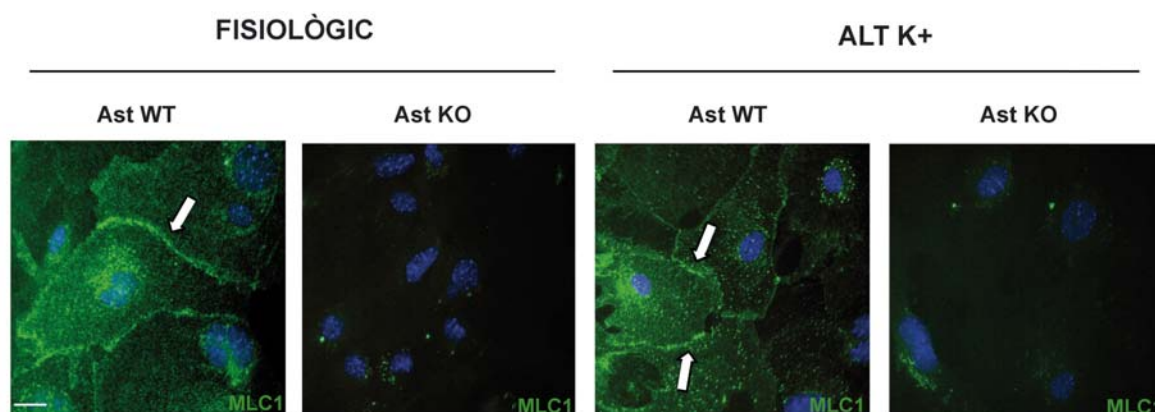
Com ja s'ha explicat en el capítol 1 de Resultats, GlialCAM en els astròcits del ratolí *knock-out* es trobava localitzada en les membranes cel·lulars, de la mateixa manera que ho feia en els astròcits del ratolí *wild-type*, a diferència del que s'havia observat en el cerebel de l'animal.

Així doncs, de la mateixa manera que s'havia fet amb els astròcits de rata, es van tractar els astròcits del ratolí *wild-type* i del *knock-out* amb els medis fisiològic i amb el que contenia un alt contingut de K^+ . En primer lloc es va estudiar la localització de MLC1 i GlialCAM endògena mitjançant immunofluorescència en aquestes condicions.

Els resultats dels experiments d'immunofluorescència indicaven que MLC1 es trobava localitzada a les membranes astrocitàries en els astròcits *wild-type*, tant en condicions fisiològiques com en condicions d'alt contingut de K^+ , i que es trobava absent en els astròcits del *knock-out* (Figura 73 A).

Quan es va estudiar la proteïna GlialCAM, es va observar que en condicions fisiològiques aquesta es trobava localitzada a les membranes cel·lulars tant en els astròcits del *wild-type* com en els astròcits del *knock-out*, tal com s'havia observat anteriorment. En canvi, en condicions d'alt contingut de K^+ s'observava que alguns dels astròcits del *knock-out* semblaven mostrar una deslocalització de GlialCAM (Figura 73 B). En els astròcits de ratolí s'havia observat que la detecció de les proteïnes endògenes no era tan clara com s'observava en els astròcits de rata. Per aquesta raó i per tal d'assegurar-nos que el K^+ estigués fent algun efecte específic sobre GlialCAM en els astròcits del *knock-out* es van infectar els astròcits de ratolí amb l'adenovirus de sobreexpressió GlialCAM-Flag generat anteriorment en el laboratori.

A)



B)

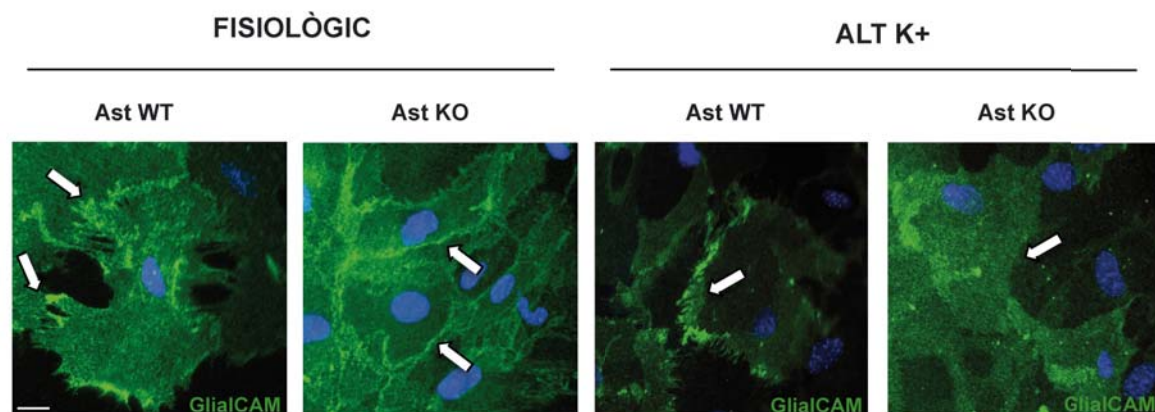


Figura 73. Estudi de la localització de les proteïnes MLC1 i GlialCAM endògenes en condicions d'alt contingut de K^+ en astròcits de ratolí *knock-out*. A) Localització de MLC1 en astròcits (Ast) WT i KO en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K^+ mitjançant immunofluorescència. La proteïna en les cèl·lules WT es localitza a la membrana cel·lular (fletxes) B) Localització de GlialCAM en astròcits (Ast) WT i KO en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K^+ mitjançant immunofluorescència. La proteïna es localitza sempre a la membrana cel·lular menys en condicions d'alt contingut de K^+ (fletxes) Dades corresponents a 4 experiments independents. Es detecta MLC1 utilitzant l'anticòs N4 (ratolí) contra la part N-terminal i GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

Així doncs, es va sobreexpressar l'adenovirus de GlialCAM-Flag 48 hores abans de realitzar l'experiment. Passat el temps necessari perquè les cèl·lules haguessin sobreexpressat la proteïna, es van tractar de la mateixa manera que s'havia fet en els casos anteriors (6 hores amb medi fisiològic i amb medi amb alt contingut de K^+). Com a control es van realitzar immunofluorescències detectant la proteïna β -Catenina (marcador d'unions) en les mateixes condicions.

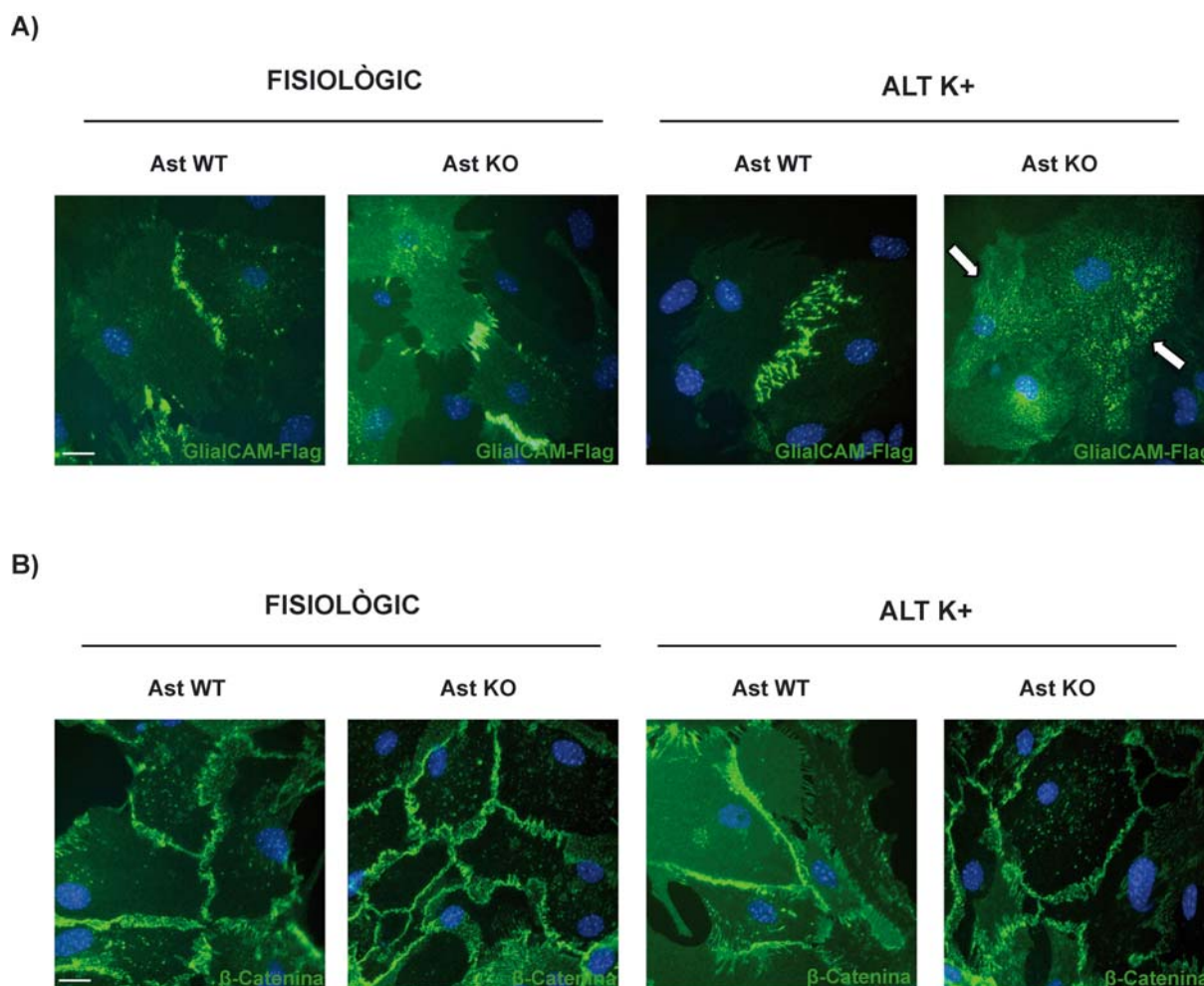


Figura 74. Estudi de la localització de GlialCAM-Flag i β -Catenina en condicions d'alt contingut de K⁺ en astròcits del ratolí *knock-out*. A) Localització de GlialCAM-Flag en astròcits (Ast) WT i KO en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K⁺ mitjançant immunofluorescència. La proteïna es localitza sempre a la membrana cel·lular menys en condicions d'alt contingut de K⁺ (fletxes) B) Localització de β -Catenina en astròcits (Ast) WT i KO en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K⁺ mitjançant immunofluorescència. S'utilitza aquest marcador com a control positiu. Dades corresponents a 4 experiments independents. Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs contra l'epítoc Flag i β -Catenina utilitzant un anticòs comercial. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

Els astròcits del *wild-type* en qualsevol condició i els astròcits del *knock-out* en condicions fisiològiques, mostraven que la proteïna es trobava localitzada a la membrana cel·lular. En canvi, els astròcits del *knock-out* que havien estat incubats amb el medi que contenia un alt contingut de K⁺ presentaven una localització intracel·lular i desordenada de GlialCAM (Figura 74 A). Els resultats d'aquest experiment van ser positius ja que molts dels astròcits del *knock-out* que havien estat tractats amb alt contingut de K⁺ semblaven patir el mateix efecte que s'havia observat anteriorment amb la proteïna endògena.

En el cas de la β -Catenina es va observar que no hi havia diferència en la localització entre els astròcits del *wild-type* i del *knock-out* ni entre els diferents tractaments (Figura 74 B).

Aquests resultats estaven reafirmant que K^+ generava algun efecte sobre la proteïna GlialCAM i que era específic

Per a quantificar d'alguna manera la deslocalització presentada per GlialCAM, quan aquesta se sobreexpressava en els astròcits del *knock-out*, es van comptar les cèl·lules analitzades per immunofluorescència i es va calcular el percentatge de les que mostraven la proteïna a les unions cel·lulars.

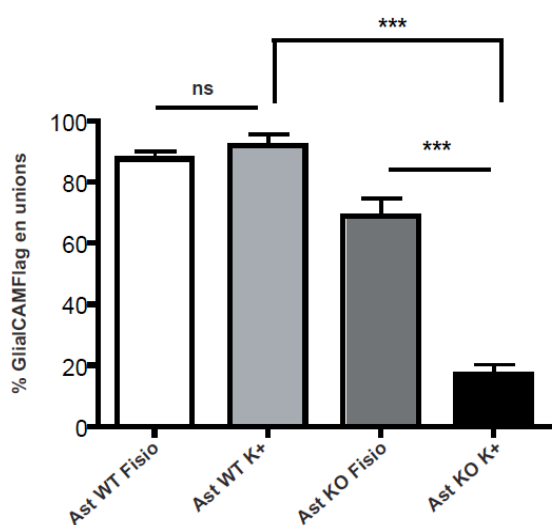


Figura 75. Quantificació de la sobreexpressió de GlialCAM-Flag en unions astrocitàries. Localització mitjançant immunofluorescències en astròcits (Ast) WT i KO en medi fisiològic i en medi amb alt contingut de K^+ . Número de cèl·lules contades : Ast WT Fisio (64); Ast WT K^+ (76); Ast KO Fisio (52); Ast KO K^+ (70). Dades corresponents a 4 experiments independents. WT:*wild-type*. KO: *knock-out*. Estadística: ns (no significatiu); $p^{***} < 0,001$ *t*-Studen no aparellada.

Així doncs, tal com s'indica a la figura 75, els astròcits del *knock-out* que havien estat infectats amb GlialCAM-Flag i que havien estat incubats en condicions d'alt contingut de K^+ mostraven un percentatge menor de GlialCAM a les membranes astrocitàries (16,8 %) respecte els astròcits del *knock-out* tractats amb medi fisiològic (68,8 %) i respecte els astròcits del *wild-type* tractats amb alt contingut de K^+ (91,9 %).

També es va observar una disminució de la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars en els astròcits del *knock-out* tractats amb medi fisiològic respecte als astròcits del *wild-type* en les mateixes condicions. Aquesta diferència no s'havia observat en els experiments en que es detectava la proteïna endògena segurament pel fet de que la marca és més difusa en aquest cultiu.

4.2 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE CIC-2 EN ELS ASTRÒCITS DEL *KNOCK-OUT*

En els astròcits de rata s'havia observat que CIC-2 es trobava localitzada en algunes membranes astrocitàries sota l'efecte del K^+ . En canvi, de la mateixa manera que GlialCAM, *in vivo* s'observava que CIC-2 es trobava deslocalitzada en la glia de Bergmann. Els astròcits del ratolí *knock-out* quan havien estat tractats amb un medi amb alt contingut de K^+ també mostraven una deslocalització de GlialCAM. Per tant va sorgir el dubte de si localització de CIC-2 en els astròcits del *knock-out* es trobava afectada quan aquests havien estat tractats amb un medi amb alt contingut de K^+ .

De la mateixa manera que s'havia fet anteriorment pels astròcits de rata i de ratolí, es van tractar de nou astròcits *wild-type* i astròcits *knock-out*, en condicions fisiològiques i d'alt contingut de K^+ , i es va estudiar la localització de CIC-2.

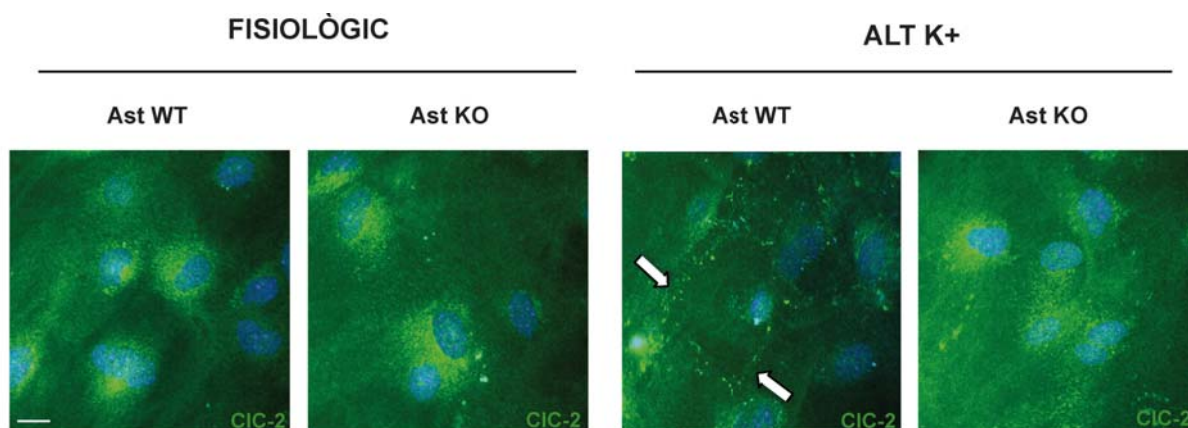


Figura 76. Estudi de la localització CIC-2 en condicions d'alt contingut de K^+ en astròcits de ratolí *knock-out*. Localització de CIC-2 en astròcits WT i KO en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K^+ mitjançant immunofluorescència. CIC-2 es localitza a la membrana cel·lular en astròcits WT en condicions d'alt contingut de K^+ (fletxes). Dades corresponents a 2 experiments independents. Es detecta CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. WT: *wild-type*; KO: *knock-out*. Barra: 20 μ m.

Els estudis d'immunofluorescència van mostrar que en els astròcits *wild-type* tractats amb medi fisiològic la proteïna es localitzava de manera intracel·lular, tal com s'observava en els astròcits de rata en condicions fisiològiques. En canvi, quan els astròcits *wild-type* estaven tractats amb el medi amb alt contingut de K^+ , CIC-2 era capaç d'arribar a les unions cel·lulars (Figura 76).

En el cas dels astròcits *knock-out*, la proteïna es localitzava intracel·lularment quan aquests es tractaven amb medi fisiològic, igual que els astròcits *wild-type* i els astròcits de rata. Però quan els astròcits del *knock-out* eren tractats amb medi amb alt contingut de K^+ , CIC-2 era incapaç d'arribar a la membrana cel·lular (Figura 76).

Aquests resultats estaven indicant que el defecte que tenia la proteïna GlialCAM en els astròcits del *knock-out*, en presència d'un alt contingut de K^+ , podria estar afectant directament a la localització de CIC-2, impedit que aquesta tampoc fos capaç de localitzar-se a les unions cel·lulars.

Avui en dia s'estan continuant els estudis amb CIC-2 per tenir més experiments i poder realitzar una quantificació. També s'estan duent a terme experiments de *Patch Clamp* en astròcits del *knock-out* en aquestes condicions per saber si el defecte observat en la localització GlialCAM i CIC-2 pot donar algun tipus de defecte funcional al canal.

PART 2: DESENVOLUPAMENT D'UN CULTIU PRIMARI D'OLIGODENDRÒCITS DE RATA PER A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ FISIOLÒGICA ENTRE GlialCAM I CIC-2.

Els oligodendròcits són cèl·lules de naturalesa neuroectodèrmica que es localitzen en la substància gris i en la substància blanca del Sistema Nerviós Central i la seva funció fonamental és la de formar i mantenir la beina de mielina que recobreix els axons. Aquestes cèl·lules tenen un paper important en la desmielinització i en la remielinització.

Les principals característiques que diferencien els oligodendròcits dels astròcits són la mida, ja que són cèl·lules més petites, la densitat del citoplasma i del nucli, l'absència del filaments intermitjos i de glicogen en el citoplasma, i la presència d'un gran nombre de microtúbuls en els seus processos que ajuden a millorar la seva estabilitat (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

La progressió al llarg del llinatge oligodendroglial es produeix per una programa altament regulat de la migració, la proliferació, la diferenciació i la mielinització (Barateiro and Fernandes, 2014). Al llarg del desenvolupament, les diferents etapes oligodendroglials poden ser identificades gràcies a la seva capacitat de migració, a la complexitat morfològica i el patró d'expressió de marcadors específics. La majoria dels autors comparteixen que la maduració dels oligodendròcits consta de quatre etapes principals (Figura 77).

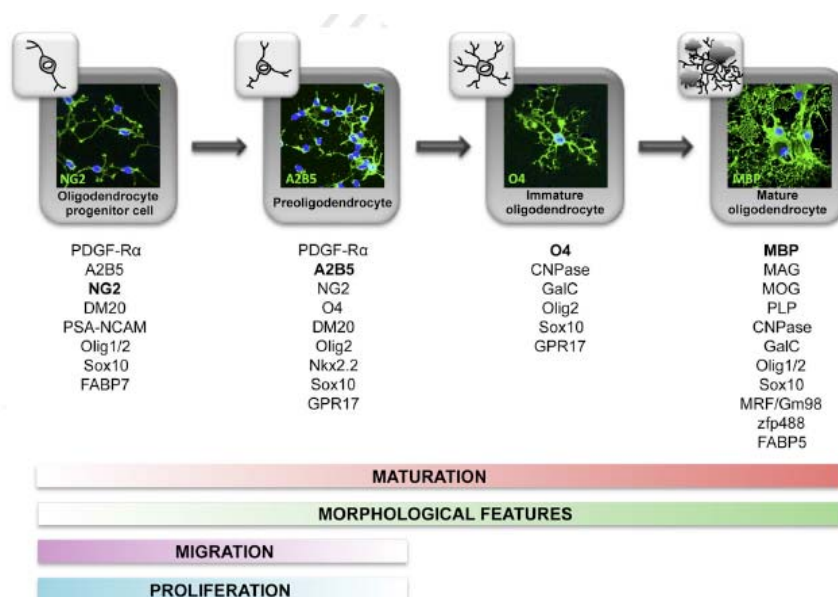


Figura 77. Esquema de la diferenciació cel·lular dels oligodendròcits. Les diferents etapes de diferenciació dels oligodendròcits són: 1) cèl·lules progenitores d'oligodendròcits, 2) Preoligodendròcits, 3) Oligodendròcits immadurs i 4) Oligodendròcits madurs. Imatge extreta de (Barateiro and Fernandes, 2014)

Els oligodendròcits juntament amb els astròcits estan interconnectats a través d'unions *gap* formades per connexines. Els tres tipus de connexines que expressen els oligodendròcits són: Cx32, Cx47 i Cx29.

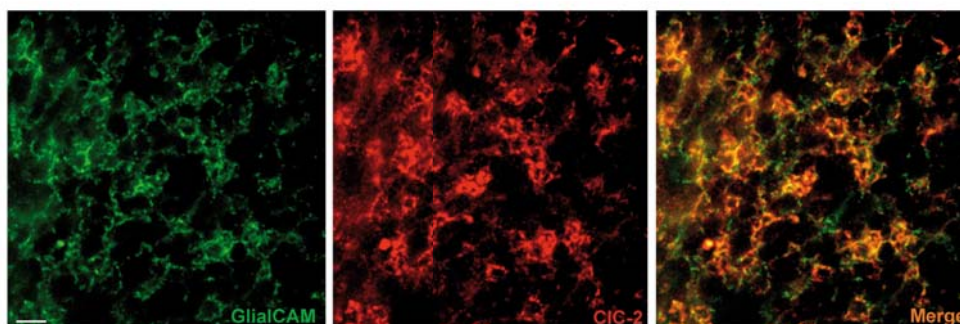
Fins al moment, en el nostre laboratori només s'havia treballat amb astròcits com a model *in vitro*, però el fet de que tant GlialCAM com CIC-2 també es trobessin localitzades en els oligodendròcits va fer pensar que aquest podria ser un possible model cel·lular per a l'estudi de la relació fisiològica entre aquestes dues proteïnes. A més, recentment s'ha publicat en el grup juntament amb el grup del Dr. Thomas Jentsch que l'absència de GlialCAM i de MLC1, en els models animals *knock-out* per aquestes dues proteïnes, afectava a la localització de GlialCAM i CIC-2 al voltant del soma dels oligodendròcits i a les corrents del canal CIC-2 en aquest tipus cel·lular (Hoegg-Beiler et al., 2014).

1. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN OLIGODENDRÒCITS DE LA SUBSTÀNCIA BLANCA DE CEREBEL DE RATA

Prèviament al desenvolupament del cultiu primari d'oligodendròcits, es van dur a terme experiments de colocalització entre GlialCAM i CIC-2 en teixit de cerebel de rata. Mitjançant dobles immunofluorescències es va detectar que GlialCAM i CIC-2 colocalitzaven en aquesta regió, concretament en els tractes mielínics al llarg dels cossos oligodendrocítics (Figura 78 A).

Paral·lelament es va realitzar una doble immunofluorescència entre GlialCAM i connexina 47, proteïna localitzada en la membrana dels oligodendròcits, com a control. Es va observar una clara colocalització entre les dues proteïnes en els tractes mielínics (Figura 78 B). Aquests resultats confirmaven la localització de GlialCAM en aquest tipus cel·lular ja descrita anteriorment.

A)



B)

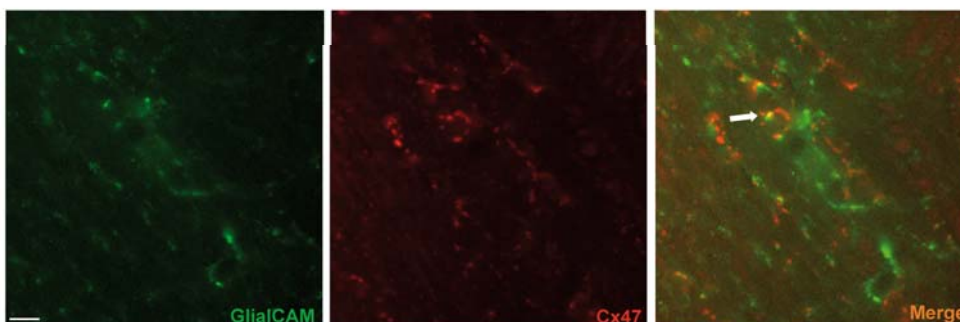


Figura 78. Estudi de la colocalització de GlialCAM amb CIC-2 i GlialCAM amb Cx47 en la substància blanca del cervell de rata A) Estudis de localització fets a partir d'immunofluorescències de doble marcatge entre GlialCAM i CIC-2. Es detecta GlialCAM utilitzant un anticòs monoclonal i CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. Barra: 20 μm . B) Estudis de localització fets a partir d'immunofluorescències de doble marcatge entre GlialCAM i Cx47. Es detecta GlialCAM utilitzant un anticòs monoclonal i Cx47 utilitzant un anticòs comercial. Barra: 40 μm .

2. CARACTERITZACIÓ DEL CULTIU PRIMARI D'OLIGODENDRÒCITS DE RATA

2.1 ESTUDI DE LOCALITZACIÓ DE MARCADORS ESPECÍFICS D'OLIGODENDRÒCITS

Després de comprovar que GlialCAM i CIC-2 colocalitzaven en aquestes cèl·lules glials, es va procedir a posar a punt el cultiu primari d'oligodendròcits de rata (apartat 3.2.2 dels Materials i Mètodes).

Es van seleccionar diferents marcadors a diferents temps de maduració per a realitzar la caracterització del model: NG2 (proteoglicà condroitinsulfat) com a marcador de cèl·lules

progenitores, A2B5 com marcador d'estadis de preoligodendròcits i MBP (proteïna bàsica de mielina) com a marcador d'oligodendròcits madurs.

Es van realitzar estudis d'immunofluorescència en el cultiu d'oligodendròcits per tal de verificar que les cèl·lules expressaven els marcadors específics de les diferents etapes de maduració. Es van obtenir resultats per als marcadors NG2 i MBP. En les imatges s'apreciava clarament el canvi de morfologia d'aquestes cèl·lules glials degut a la diferenciació. Les cèl·lules progenitores (NG2 positives) mostraven reactivitat en el seu cos i en els seus processos. Tenien processos curts i acostumaven a ser cèl·lules petites i que ocupaven poc espai. En el cas de MBP, s'observava reactivitat en cèl·lules molt desenvolupades amb una gran quantitat de processos fins que acabaven formant una xarxa. Els processos fins sorgien del processos més gruixuts els quals sorgien del cos de l'oligodendròcit (Figura 79).

Els estudis realitzats pel marcador A2B5 van ser negatius, ja que aquest no es va poder detectar en els oligodendròcits. Possiblement, el problema venia donat per la poca especificitat de l'anticòs utilitzat.

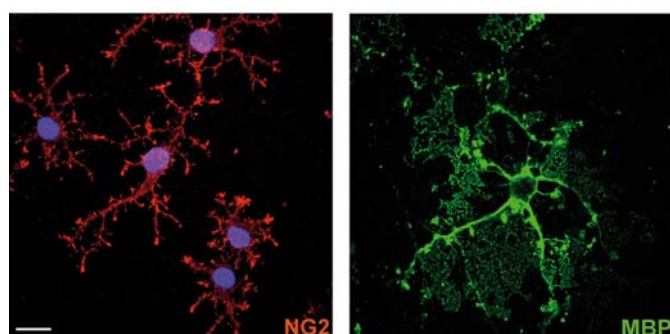


Figura 79. Localització de marcadors específics d'oligodendròcits. NG2, marcador específic de cèl·lules progenitores. MBP marcador específic d'oligodendròcits madurs. Barra: 20 μ m.

2.2 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE GlialCAM I CIC-2 EN EL CULTIU PRIMARI D'OLIGODENDRÒCITS

El següent pas era estudiar en quines etapes de maduració s'expressaven les proteïnes GlialCAM i CIC-2. Per a l'estudi de localització de les proteïnes GlialCAM i CIC-2 es van realitzar immunofluorescències en oligodendròcits sense diferenciar amb o sense NG2, i en oligodendròcits diferenciats juntament amb MBP.

Els oligodendròcits no diferenciats amb NG2 presentaven una marca de GlialCAM difusa en tots els processos cel·lulars (Figura 80 A). En el cas de la proteïna CIC-2 també s'observava una marca difusa al llarg dels processos i una marca més intensa en el nucli i al seu voltant

(Figura 80 B). El fet de que els oligodendròcits fossin cèl·lules més petites i amb un cos molt petit dificultava l'observació d'aquestes dues proteïnes a la membrana cel·lular.

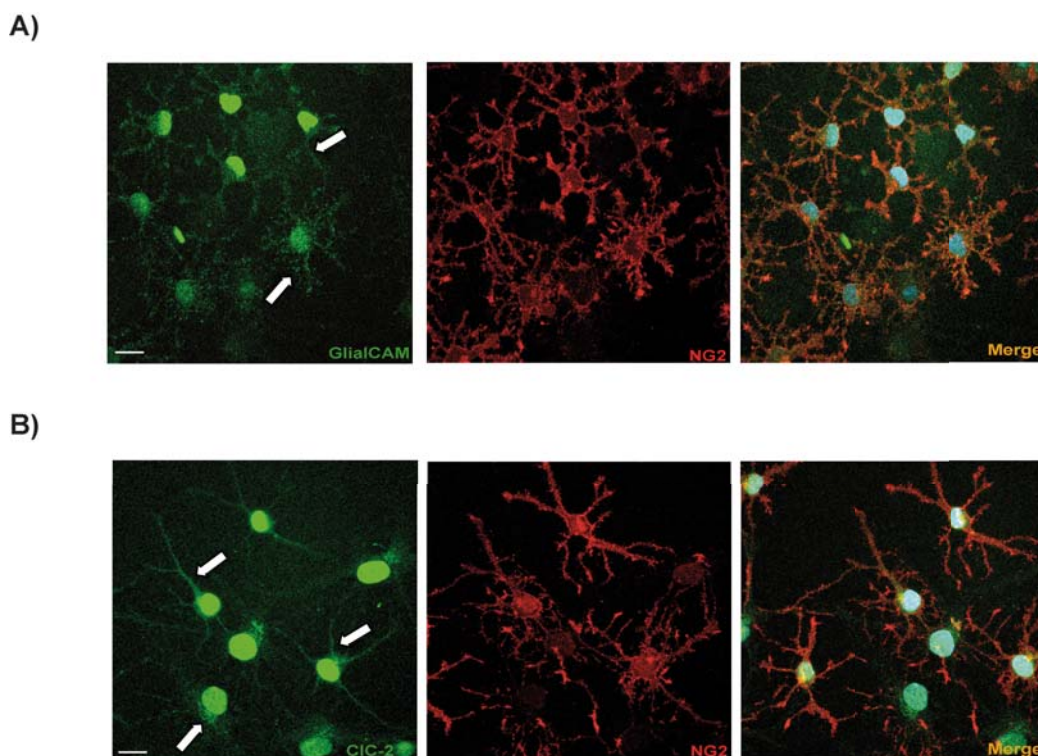


Figura 80. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 juntament amb el marcador NG2 en oligodendròcits de rata no diferenciats. A) Localització de GlialCAM mitjançant immunofluorescència. La proteïna s'observa de manera discreta (fletxes). B) Localització de CIC-2 mitjançant immunofluorescència. La proteïna s'observa en els processos i en el nucli i al seu voltant (fletxes). Dades corresponents a 2 experiments independents. . Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal, CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal i NG2 utilitzant un anticòs comercial. Barra: 20 μ m.

Tot i no disposar d'un marcador d'etapes intermitges de la maduració, es van realitzar altres estudis d'immunofluorescència en oligodendròcits no diferenciats per saber si GlialCAM i CIC-2 s'expressava en etapes en què les cèl·lules podrien ser preoligodendròcits o oligodendròcits madurs.

Les imatges van mostrar una clara marca de GlialCAM per tota la membrana del cos de oligodendròcit que s'extenia des dels processos principals fins a les petites ramificacions (Figura 81 A). En el cas de CIC-2 també es va observar una marca en els processos però de manera més difusa i sense marca a la membrana (Figura 81 B). En aquest cas també es va observa marcade CIC-2 als nuclis de les cèl·lules i al seu voltant. És necessari corroborar aquests resultats amb un marcador equivalent a les diferents etapes de maduració.

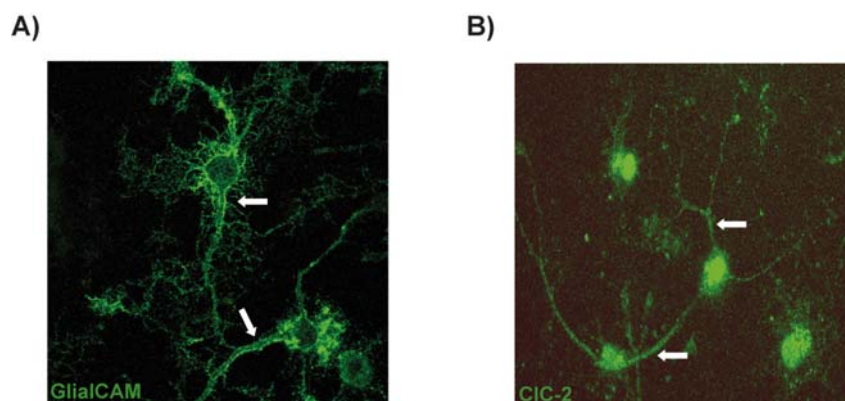


Figura 81. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 en oligodendròcits de rata no diferenciats. A) Localització de GlialCAM a la membrana dels oligodendròcits al voltant del cos i en els processos (fletxes). B) Localització de CIC-2 en els processos oligodendrocítics i en el nucli (fletxes). Dades corresponents a 2 experiments independents. . Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal i CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal Barra: 20 μ m.

Paral·lelament també es van realitzar immunofluorescències amb MBP en oligodendròcits diferenciats durant 3 dies. En aquests experiments es va observar que en els oligodendròcits madurs, GlialCAM també es localitzava a la membrana cel·lular al voltant del cos cel·lular i en els processos oligodendrocítics (Figura 82 A). En aquest cas CIC-2 també s'observava de manera difusa, principalment en algun procés i al voltant del nucli (Figura 82 B).

Aquests resultats indicaven que les proteïnes GlialCAM i CIC-2 s'expressaven al llarg del procés de maduració dels oligodendròcits. Aquestes dues proteïnes semblaven trobar-se en localitzacions similars a les observades en els astròcits, GlialCAM principalment s'observava en els processos oligodendrocítics i a la membrana cel·lular i CIC-2 es detectava de manera més difusa i propera al nucli.

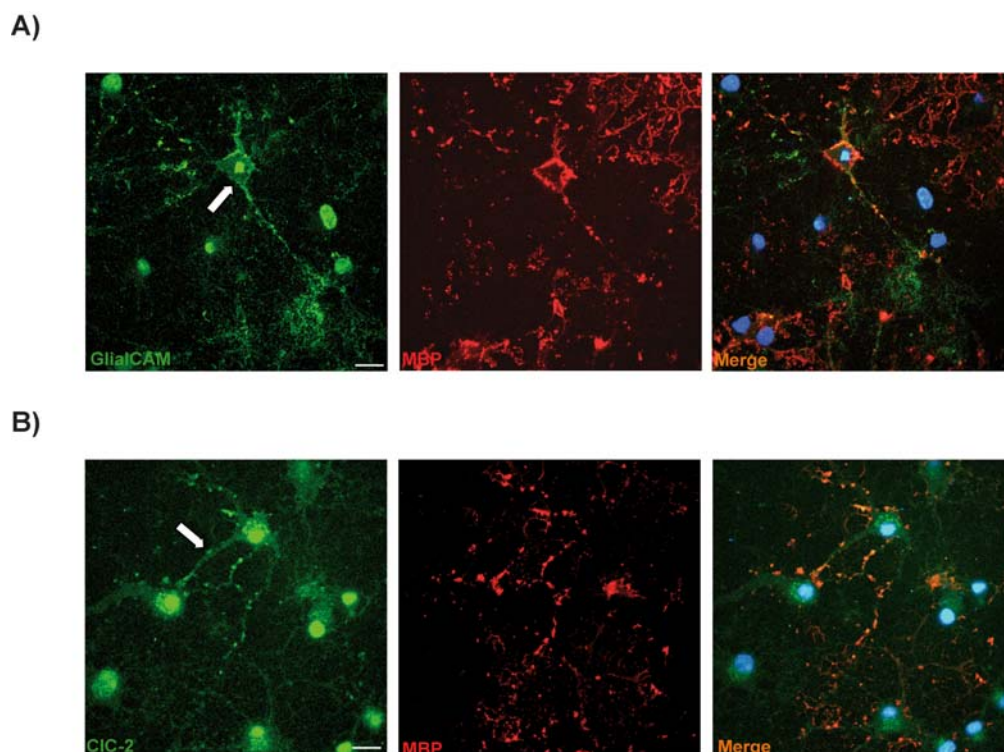


Figura 82. Estudi de la localització de GlialCAM i CIC-2 juntament amb el marcador MBP en oligodendròcits de rata. . A) Localització de GlialCAM mitjançant immunofluorescència. La proteïna s'observa a la membrana de la cèl·lula (fletxa). B) Localització de CIC-2 mitjançant immunofluorescència. La proteïna s'observa en els processos oligodendrocítics i al voltant del nucli (fletxa). Dades corresponents a 2 experiments independents. Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs C2 contra la part C-terminal, CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal i MBP utilitzant un anticòs comercial. Barra: 20 μm .

En base a aquests primers resultats i tenint en compte els estudis posteriors que es volien realitzar, es va acordar utilitzar el cultiu primari d'oligodendròcits sense diferenciar ja que en aquestes condicions ja s'havia detectat una bona marca de GlialCAM a la membrana de la cèl·lula. Pel que fa a la marca de CIC-2 no semblava variar en les diferents etapes de diferenciació.

3. ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'ALGUNES MUTACIONS DE GlialCAM EN OLIGODENDRÒCITS

Es coneix que GlialCAM és una molècula que es localitza principalment a les membranes cel·lulars. Anteriorment en el grup, s'havien estudiat variants mutades (dominants i recessives) de la proteïna en astròcits de rata i en cèl·lules HeLa (López-Hernández et al., 2011a, 2011b). Avui en dia encara no es coneix perquè algunes mutacions es comporten com a recessives i altres com a dominants i si tenen diferents propietats bioquímiques.

Actualment, en el grup s'estan estudiant i caracteritzant noves mutacions de GlialCAM trobades en pacients amb la malaltia MLC mitjançant el cultiu primari d'astròcits de rata i mitjançant el cultiu primari d'astròcits del *knock-out*.

Així doncs les mutacions descrites en *GLIALCAM* s'han classificat de la següent manera: 1) les que redueixen els nivells de proteïna; 2) les que mostren defecte en l'oligomerització i en el tràfic; 3) les que no mostren defectes en l'oligomerització però sí en el tràfic; 4) les que no mostren cap defecte i 5) les que mostren defectes en absència de MLC1 (observat en astròcits del *knock-out*).

En aquest treball es van estudiar diferents variants mutants, dominants i recessives, en el cultiu primari d'oligodendròcits. Es volia saber si en aquest tipus cel·lular aquestes mutacions presentaven un comportament de localització semblant a l'observat en els astròcits.

Es van seleccionar diferents mutacions dominants i recessives. Les mutacions dominants que es van estudiar van ser: GlialR92W, GlialK135Del, GlialD128N i GlialG89S. Les mutacions recessives van ser: GlialR92Q, GlialP148S i GlialD211N. Així doncs, aquestes variants mutants es van infectar mitjançant adenovirus de sobreexpressió 48 hores abans de realitzar l'experiment, i posteriorment, es va estudiar la seva localització mitjançant immunofluorescència.

Es va observar que GlialCAM *wild-type* es localitzava principalment a la membrana que envolta el soma de l'oligodendròcit, rodejant el nucli, i en els processos oligodendrocítics. En el cas dels mutants es va detectar que n'hi havia dos, el K135Del i el D211N que presentaven una localització molt intensa per tot l'oligodendròcit, tant en els processos com en el cos. La localització d'aquestes variants semblava ser més intensa que la proteïna *wild-type* (Figura 83). Aquestes dues variants pertanyen al grup de mutacions que en astròcits no mostren cap defecte (dades no publicades).

També es va observar que hi havia tres mutants, R92W, G89S i D128N que presentaven una localització com més desordenada en els processos i formaven agregats al costat del nucli de la cèl·lula (Figura 83, fletxes). Aquestes tres variants són mutacions dominants. La resta de mutants, R92Q i P148S presentaven una senyal més difusa que la resta de mutants i mostraven la proteïna de manera desordenada principalment en els processos de la cèl·lula. A excepció de P148S, que en astròcits de rata no mostra cap tipus de defecte, la resta semblaven mantenir el mateix comportament que en els astròcits.

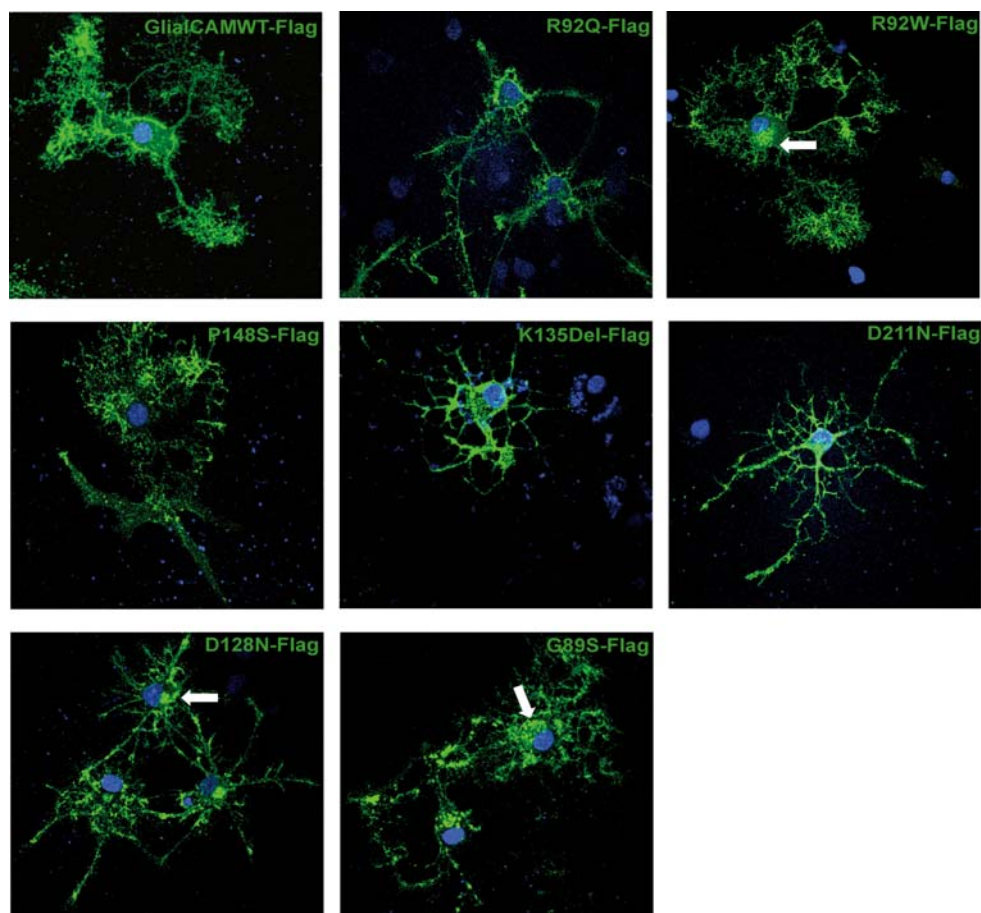


Figura 83. Estudi de la localització de diferents mutants de GlialCAM en el cultiu primari d'oligodendròcits. Estudi de la localització mitjançant immunofluorescència en oligodendròcits de rata infectats amb adenovirus de GlialCAMWT-Flag, GlialR92Q-Flag, GlialCAM R92W-Flag, GlialCAMP148S-Flag, GlialCAMK135Del-Flag, GlialCAMD211N-Flag, GlialCAMD128N-Flag, GlialCAMG89S-Flag. Els mutants GlialCAM R92W-Flag, GlialCAMD128N-Flag, GlialCAMG89S-Flag mostren agregats en el cos de l'oligodendròcit (fletxes). Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta GlialCAM utilitzant l'anticòs contra l'epítol Flag. Barra: 20 μ m.

Fins al moment no s'ha pogut explicar amb exactitud el patró de comportament que segueixen les mutacions descrites en el gen *GLIALCAM*. Aquests són resultats preliminars els quals s'han intentat quantificar però es necessitaria de més experiments per a poder determinar amb exactitud quin és el comportament exacte d'aquestes mutacions en els oligodendròcits.

4. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE CIC-2 EN CONDICIONS D'ALT CONTINGUT DE K⁺ EN OLIGODENDRÒCITS

De la mateixa manera que s'havia fet en els astròcits, tant de ratolí com de rata, es va estudiar si la localització de CIC-2 en el cultiu primari d'oligodendròcits amb condicions d'alt contingut de K⁺ també canviava. El disseny de l'experiment va ser el mateix que es va utilitzar per als astròcits.

Els oligodendròcits es van tractar amb el medi fisiològic o amb el medi amb alt contingut de K⁺. Els oligodendròcits que havien estat tractats amb el medi que contenia un alt contingut de K⁺, presentaven una marca més intensa de CIC-2 en els processos respecte els oligodendròcits tractats amb medi fisiològic (Figura 84, fletxes). Aquests resultats indicaven que el K⁺ també causava un efecte sobre CIC-2 en aquest tipus cel·lular.

Aquests experiments són preliminars. Caldria continuar-los realitzant experiments de *Patch Clamp* en aquestes cèl·lules per a comprovar si, en aquest cas, l'efecte del K⁺ també repercuteix en que hi hagi un canvi en l'activitat del canal CIC-2 en aquest tipus cel·lular.

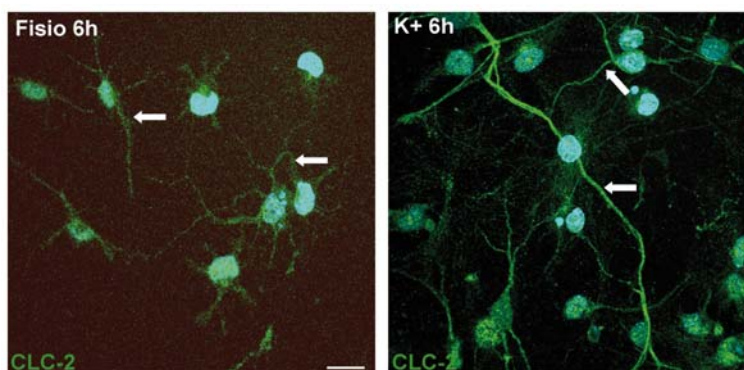


Figura 84. Estudi de la localització de CIC-2 en condicions d'alt contingut de K⁺ en el cultiu primari d'oligodendròcits de rata. Localització de la proteïna CIC-2 mitjançant immunofluorescència en condicions fisiològiques i en condicions d'alt contingut de K⁺. Dades corresponents a 2 experiments independents. Es detecta CIC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. Barra: 20 µm.

Els resultats presentats per aquest nou model cel·lular són preliminars. Durant la realització d'aquest treball només s'ha pogut arribar fins aquest punt. Es suggereix que en un futur es podrien continuar els estudis sobre la relació fisiològica entre GlialCAM i CIC-2 amb aquest model i es podria posar a punt un cultiu primari d'oligodendròcits del ratolí *knock-out* per tal de verificar si l'absència de MLC1 provoca un defecte sobre GlialCAM i CIC-2 tal i com s'ha observat en el teixit.

CAPÍTOL 4.

ESTUDI DE zMLC1 I zGlialCAMa *IN VITRO* I

EN EL MODEL *KNOCK-OUT* PER *zmlc1* EN

PEIX ZEBRA

La recerca biomèdica depèn de l'utilització d'animals per entendre la patogènesis de malalties humanes a nivell cel·lular i molecular. Models de mamífers, com el ratolí, són dels més utilitzats ja que mantenen una gran similitud amb el genoma humà, amb la biologia cel·lular i amb la fisiologia dels humans.

Avui en dia, però, s'utilitzen altres models animals, com el peix zebra (*Danio rerio*), perquè ofereix un gran ventall d'avantatges com per exemple el baix cost en comparació amb el ratolí, la capacitat d'aplicar tècniques genètiques a gran escala i la claredat òptica dels embrions, fet que permet una visualització *in vivo* i a temps real (Lieschke and Currie, 2007).

Gràcies als coneixements del Dr. Alejandro Barrallo, en el laboratori es va desenvolupar un model *knock-out* per al gen *zmlc1* per tal de poder avançar en la recerca de la leucodistrofia MLC.

En un primer instant es va voler generar el model *knock-out* en peix zebra a partir de la tècnica de *TILLING* (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) mitjançant els serveis *Zebrafish Tilling Project* que disposava el Centre d'Investigació Fred Hutchinson. En la seqüenciació dels primers exons no es va detectar cap codó *stop* ni cap mutació que pogués acabar suprimint l'expressió normal de la proteïna, però es va detectar una mutació *missense* (c.241T>G) en un al·lel (MLC1^{fh328}). Aquesta era una mutació que es trobava localitzada en el primer domini transmembrana i que canviava un residu hidròfob (isoleucina) per un residu amb càrrega positiva (arginina). L'introducció d'aquesta càrrega positiva seria perjudicial per a la proteïna.

Anteriorment, la Dra. Tania López havia començat a desenvolupar algunes de les eines necessàries per a l'estudi del peix *knock-out*. Primerament es va clonar el gen ortòleg per MLC1, el qual s'ha anomenat zMLC1, es va revisar que la seqüència fos correcta i es va procedir a expressar-lo en cèl·lules HeLa, però cap dels anticossos fets en el laboratori contra la proteïna MLC1 eren capaços de detectar-lo. Per aquesta raó es va generar un anticòs contra la proteïna zMLC1. Aquest nou anticòs va ser provat en cèl·lules HeLa, a les quals se'ls havia transfectat la proteïna zMLC1 prèviament, i en aquest cas els resultats van ser positius. La proteïna mantenia el seu pes molecular i es localitzava en les membranes cel·lulars.

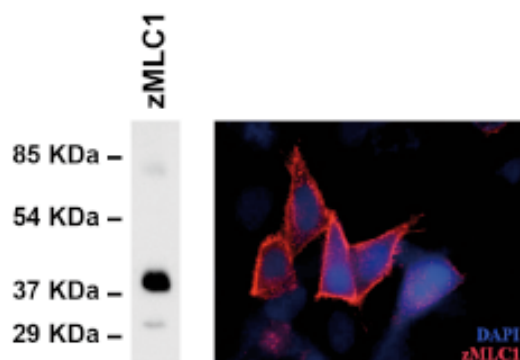


Figura 85. Anàlisi de la proteïna zMLC1 en cèl·lules HeLa. Cèl·lules HeLa transfectades amb zMLC1 analitzades per WB i per immunofluorescència utilitzant l'anticòs purificat contra la proteïna zMLC1. Imatge extreta de la tesi de la Dra. Tania López Hernández.

Posteriorment, aquest anticòs contra la proteïna zMLC1 és va utilitzar per a la detecció de la proteïna en teixits de peix zebra adult. Els resultats van mostrar la presència de zMLC1 en el cervell i de manera més discreta en l'ull (Sirisi et al., 2014).

1. ESTUDI DE zGlialCAMa *IN VITRO*

La Dra. Tania López anteriorment havia començat els estudis amb el gen ortòleg zGlialCAM. Es va trobar que existien dos gens ortòlegs per la proteïna GlialCAM en el peix zebra: zGlialCAMa i zGlialCAMb.

Aquests gens es van clonar i s'hi van fusionar tres epítops Flag per tal de poder-los detectar *in vitro*, ja que en aquell moment no es disposava de cap anticòs contra la proteïna.

Els resultats van mostrar que la variant zGlialCAMa s'expressava millor que la variant zGlialCAMb i que mostrava un comportament similar a la proteïna humana. La variant zGlialCAMa es localitzava en les membranes i unions cel·lulars mentre que la variant zGlialCAMb presentava un marcatge difús de manera intracel·lular i no era capaç d'arribar a la membrana plasmàtica (Figura 86).

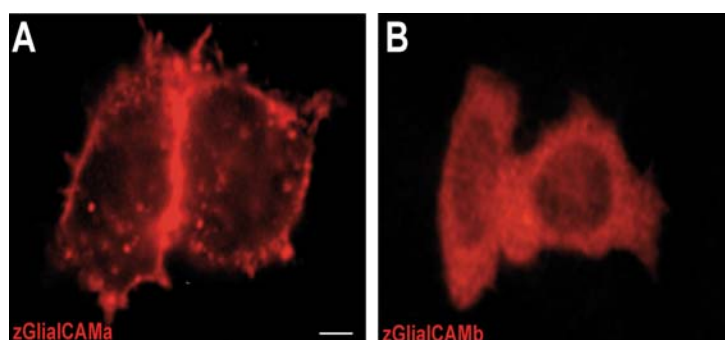


Figura 86. Estudi de la localització de zGlialCAMa i zGlialCAMb en cèl·lules HeLa. A) zGlialCAMa. B) zGlialCAMb. Es detecta zGlialCAM utilitzant l'anticòs contra l'epítip Flag. Barra: 20 μ m. Imatge extreta i modificada de la tesi de la Dra. Tania López Hernández.

1.1 PURIFICACIÓ DE L'ANTICÒS CONTRA LA PROTEÏNA zGlialCAMA

Tal i com s'ha explicat en l'apartat 2.3 de Materials i Mètodes, es va generar un anticòs contra la part C-terminal de la proteïna zGlialCAMA i es va purificar en el laboratori.

Per a verificar que l'anticòs que s'havia generat era específic es van realitzar experiments d'expressió i localització en cèl·lules HeLa.

Es va transfectar el plàsmid zGlialCAMA-Flag i es van realitzar estudis dels nivells de proteïna i de localització utilitzant l'anticòs contra Flag com a control positiu i l'anticòs contra zGlialCAMA. Com control negatiu es van utilitzar cèl·lules sense transfectar.

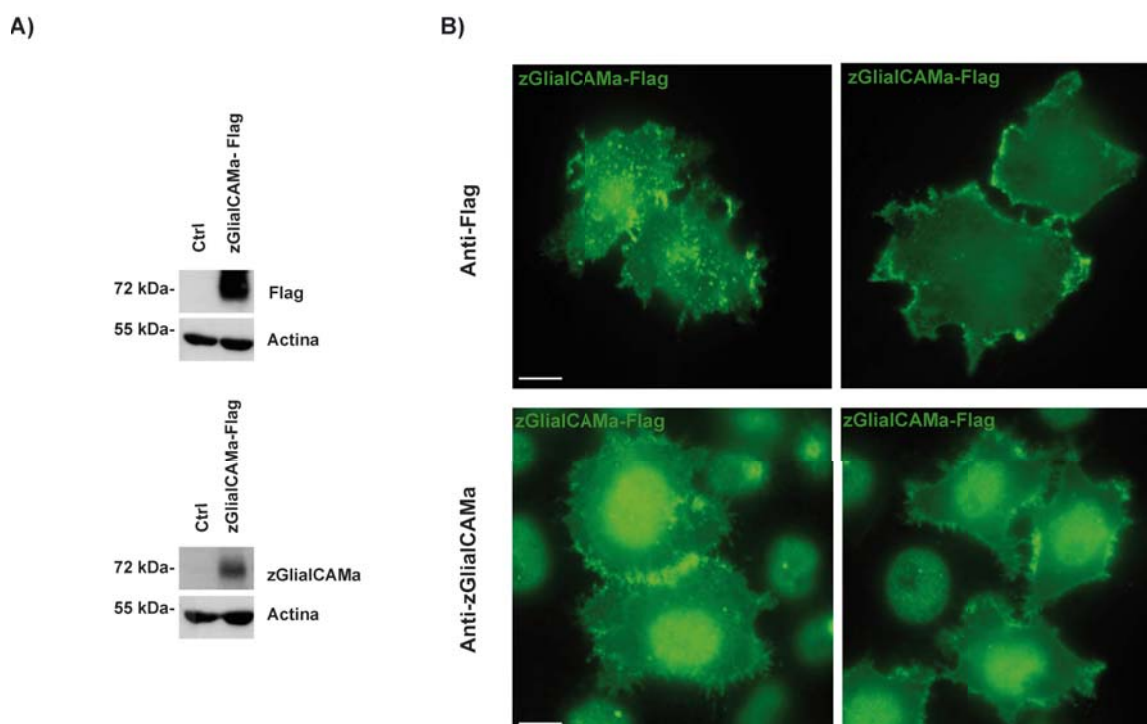


Figura 87. Anàlisi de zGlialCAMA en cèl·lules HeLa. A) Estudi de l'expressió mitjançant WB en cèl·lules transfectades amb zGlialCAMA-Flag. Es detecta la proteïna utilitzant l'anticòs contra Flag com a control positiu i amb l'anticòs contra la proteïna zGlialCAMA. El control negatiu són cèl·lules sense transfectar. S'utilitza l'actina com a control de càrrega. B) Estudi de la localització a partir d'immunofluorescències en cèl·lules HeLa transfectades amb zGlialCAMA. Es detecta zGlialCAMA utilitzant l'anticòs contra Flag com a control positiu i amb l'anticòs generat contra la proteïna. Barra: 20 μ m.

A partir d'aquests estudis es va observar que l'anticòs era específic per a la proteïna zGlialCAMA. El WB mostrava el pes molecular predit de la proteïna de la mateixa manera que ho feia quan s'utilitzava l'anticòs contra Flag (Figura 87 A). Les imatges d'immunofluorescència mostraven que zGlialCAMA era capaç de localitzar-se en les unions cel·lulars i a les membranes cel·lulars utilitzant l'anticòs contra Flag. Utilitzant l'anticòs

Es va observar que la seqüència de la proteïna GlialCAM es trobava altament conservada entre les espècies de peix zebra, ratolí i humà, principalment en els dominis Ig extracel·lulars. En canvi en el domini C-terminal, a la part intracel·lular, hi havia menys residus conservats. Les mutacions que es descriuen en aquest apartat experimental també es trobaven conservades en peix zebra, ratolí i humà (Figura 88).

Les variants de la proteïna humana d'aquestes mutacions s'havien estudiat anteriorment en cèl·lules HeLa i en astròcits de rata. Estudis en cèl·lules HeLa demostren que aquestes mutacions no eren capaces de localitzar la proteïna a les unions cel·lulars però sí a la membrana plasmàtica en alguns casos (López-Hernández et al., 2011b). En canvi, estudis de les mutacions en astròcits van mostrar que la proteïna era incapaç d'arribar a la membrana presentant un marcatge difús intracel·lular (López-Hernández et al., 2011a). Aquests resultats indicaven que aquestes mutacions mostraven defecte en el tràfic.

Així doncs, es va decidir estudiar la localització i els nivells d'expressió d'aquestes mutacions presentades per la proteïna en cèl·lules HeLa utilitzant l'anticòs contra Flag i l'anticòs contra la proteïna zGlialCAMa.

Per a poder quantificar si realment existia un enriquiment a les unions cel·lulars es va calcular el guany d'intensitat de fluorescència a les unions ($R = \text{intensitat de fluorescència a la unió} / \text{mitja de l'intensitat de fluorescència a la membrana de la cèl·lula 1} + \text{mitja de l'intensitat de fluorescència a la membrana de la cèl·lula 2}$). Aquest càlcul es va realitzar mitjançant el programa *ImageJ*, en què es traça una línia al llarg de les dues cèl·lules estudiades i s'obté un perfil d'intensitat.

Els resultats d'aquest experiment, utilitzant l'anticòs contra Flag, van mostrar que les tres mutacions analitzades, zGlialCAM-G89S, zGlialCAM-G89D i zGlialCAM-D128N, localitzaven la proteïna en unions cel·lulars en alguns casos i de manera intracel·lular en altres (Figura 89 A). Es per això que es va realitzar un comptatge de cèl·lules per saber quin era el percentatge capaç de localitzar la proteïna a les unions cel·lulars. Els resultats del comptatge van mostrar que les tres mutacions arribaven en menor percentatge a unions cel·lulars respecte la proteïna *wild-type*, mostrant diferències estadísticament significatives (Figura 89 B).

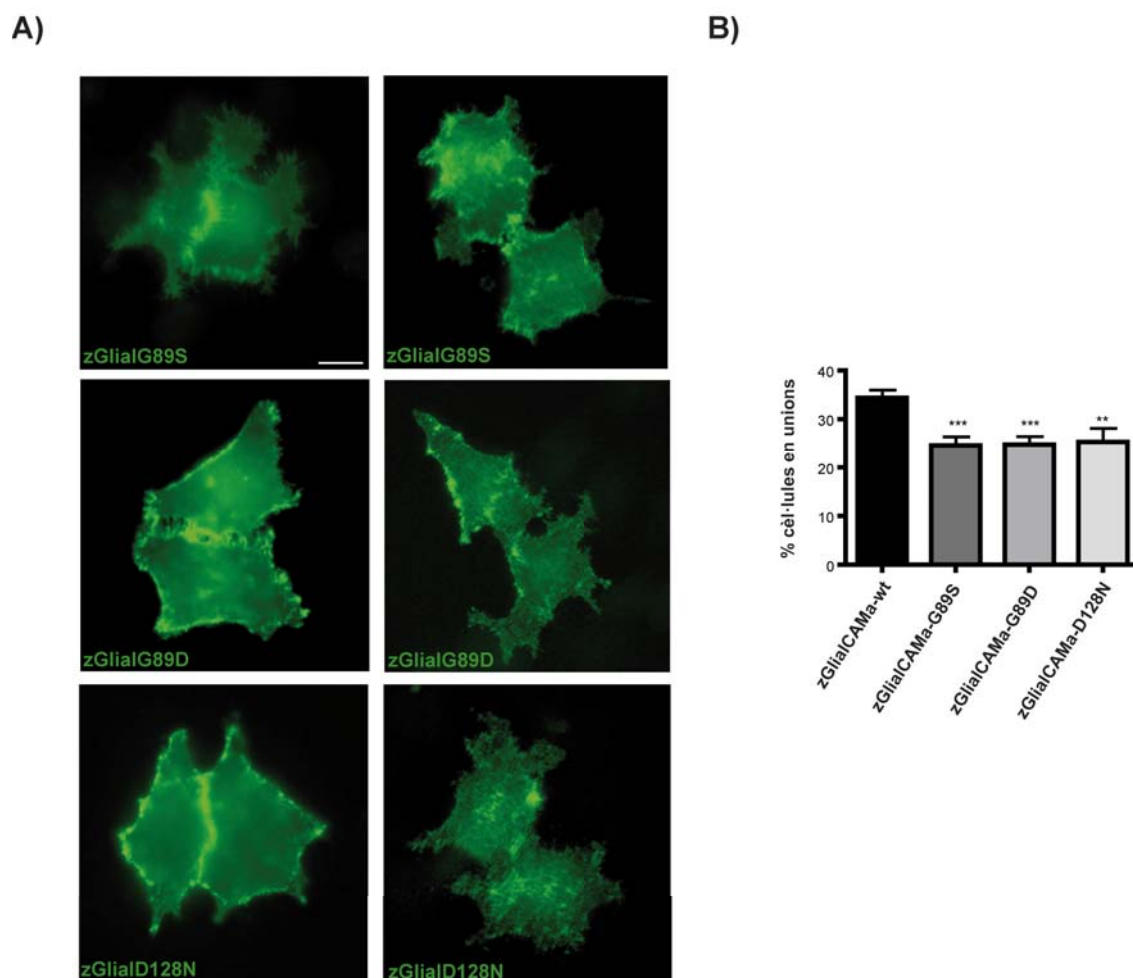


Figura 89. Estudi de la localització de les mutacions de zGliaCAMa en cèl·lules HeLa. A) Localització de les variants mutants mitjançant immunofluorescències en cèl·lules HeLa i utilitzant l'anticòs contra Flag. B) Representació gràfica del percentatge de cèl·lules que són capaces de localitzar la proteïna a les unions cel·lulars. zGliaCAM-wt n=14 (719 cèl·lules contades); zGliaCAM-G89S n=10 (510 cèl·lules contades); zGliaCAM-G89D n=9 (460 cèl·lules contades); zGliaCAM-D128N n=9 (486 cèl·lules contades). Estadística utilitzada: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *t*-Student no aparellada. Barra: 20 μm .

Paral·lelament es va realitzar el mateix experiment utilitzant l'anticòs contra zGliaCAMa. En aquest cas, també es van realitzar immunofluorescències per tal d'estudiar la localització dels mutants i posteriorment es va fer el recompte de cèl·lules. De la mateixa manera que utilitzant l'anticòs contra Flag, es va observar que la localització dels mutants podia ser tan a les unions cel·lulars com de manera intracel·lular (Figura 90 A). El comptatge de cèl·lules indicava que les variants mutades arribaven en menor percentatge a les unions cel·lulars respecte la proteïna *wild-type* (Figura 90 B). Aquests resultats també van ser estadísticament significatius.

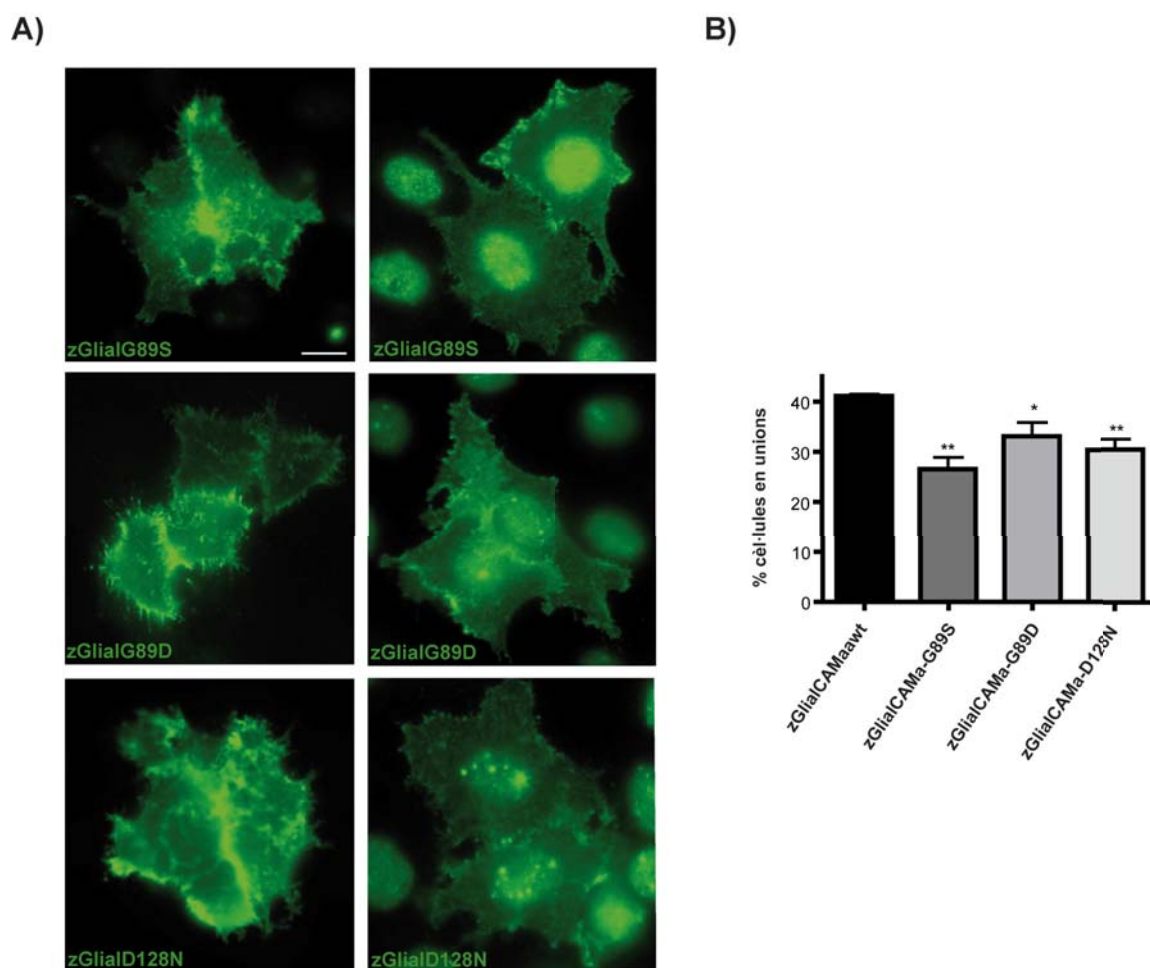


Figura 90. Estudi de la localització de les mutacions de zGliaCAMa en cèl·lules HeLa. A) Localització de les variants mutants mitjançant immunofluorescències en cèl·lules HeLa utilitzant l'anticòs contra la proteïna zGliaCAMa. B) Representació gràfica del percentatge de cèl·lules que són capaces de localitzar la proteïna a les unions cel·lulars. zGliaCAMawt n=4 (142 cèl·lules contades); zGliaCAMa-G89S n=5 (155 cèl·lules contades); zGliaCAMa-G89D n=5 (202 cèl·lules contades); zGliaCAMa-D128N n=5 (148 cèl·lules contades). Estadística utilitzada: ** p<0,01; * p<0,05; t-Student no aparellada. Barra: 20 µm.

Aquests resultats eren similars als que s'havien obtingut amb aquestes i altres variants de la proteïna humana (López-Hernández et al., 2011b), indicant que les variants mutades de zGliaCAMa es comportaven de la mateixa manera i mostraven un defecte en el tràfic.

1.3 ESTUDI DELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ DELS MUTANTS DE zGliaCAMa

Posteriorment a l'estudi de la localització de les variants de zGliaCAMa *wild-type*, es va procedir a realitzar estudis de WB d'aquestes variants.

En aquest cas també es va realitzar l'experiment detectant l'epítot Flag o detectant la proteïna zGliaCAMa. Tal i com s'observa a la figura 91, les mutacions dominants estudiades de zGliaCAMa mostraven els seus nivells d'expressió similars a la proteïna *wild-type*, de la

mateixa manera que s'havia observat amb les variants de la proteïna humana estudiades en astròcits de rata (López-Hernández et al., 2011a). Aquests resultats indicaven que la proteïna no es degradava sinó que només mostrava una localització defectiva.

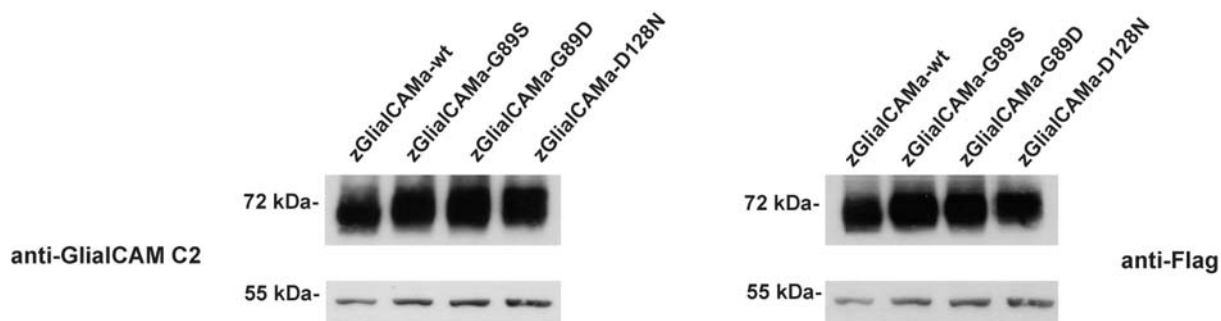


Figura 91. Estudi dels nivells d'expressió de les mutacions dominants de zGlialCAMa. Estudi de l'expressió mitjançant WB en cèl·lules HeLa transfectades utilitzant l'anticòs contra la proteïna zGlialCAMa i l'anticòs contra Flag. Dades corresponents a 3 experiments independents. S'utilitza l'actina com a control de càrrega.

2. ESTUDI DE zMLC1 I rCIC-2 EN PRESENCIA DE zGlialCAMa

2.1 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE zMLC1 I rCLC-2 AMB PRESENCIA DE zGlialCAMa *IN VITRO*

En els anteriors capítols s'explica que GlialCAM és capaç de dirigir el tràfic de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars. Per tan el següent pas era estudiar si zGlialCAM també seria capaç de portar zMLC1 i rCIC-2 a unions. En el cas de CIC-2 és va utilitzar la variant de la proteïna de rata ja que recentment en el grup s'ha trobat que existeixen tres ortòlegs de la proteïna en el peix zebra: zCIC-2a, zCIC-2b i zCIC-2c. Actualment la companya de laboratori, Carla Pérez Rius està realitzant diferents estudis d'aquestes proteïnes.

Els resultats dels estudis de localització indicaven que zGlialCAMa, també en aquest cas, era capaç de localitzar a zMLC1 a les unions cel·lulars de la mateixa manera que ho feia la proteïna humana (Figura 92 A). En el cas de rCLC-2, quan aquesta es trobava en presència de zGlialCAMa també era capaç de localitzar-se en les unions entre cèl·lules (Figura 92 B). Els resultats obtinguts indicaven que la proteïna zGlialCAM de peix zebra tenia el mateix comportament que la proteïna humana estudiada anteriorment.

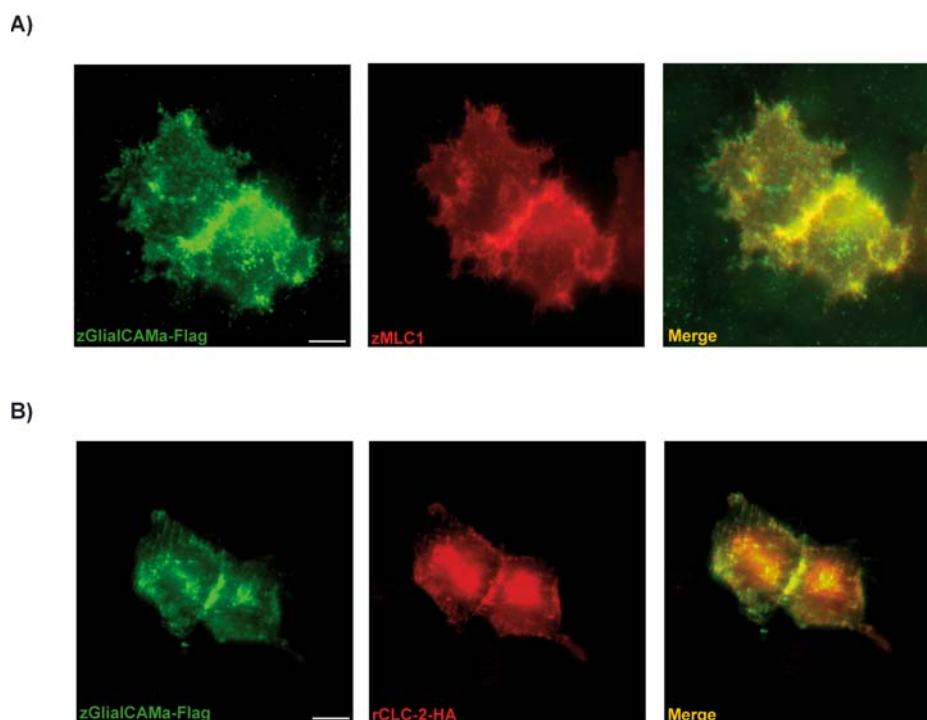


Figura 92. Estudi de la localització de zMLC1 i rCLC-2 amb presència zGlialCAMa en cèl·lules HeLa. A) Localització de zMLC1 mitjançant immunofluorescència de doble marcatge amb zGlialCAMa en cèl·lules HeLa. B) Localització de rCLC-2 mitjançant immunofluorescència de doble marcatge amb zGlialCAMa en cèl·lules HeLa. Dades corresponents a 3 experiments independents. Es detecta zMLC1 utilitzant l'anticòs contra aquesta proteïna, zGlialCAMa utilitzant l'anticòs contra l'epítot Flag i CLC-2 utilitzant l'anticòs Ct contra la part C-terminal. Barra: 20 μm .

2.2 ESTUDIS ELECTROFISIOLÒGICS rCLC-2 EN PRESENCIA DE zGlialCAMa EN OÒCITS DE *XENOPUS*

Tal i com ja s'ha explicat anteriorment s'havia descrit que GlialCAM tenia la capacitat de modificar les propietats d'activació i de rectificació del canal CLC-2 (Jeworutzki et al., 2012). Es per això que es va plantejar dur a terme experiments en oòcits de *Xenopus* per saber si zGlialCAMa també era capaç de modificar les propietats del canal, tal i com ho feia la proteïna humana. Aquests experiments van ser realitzats pel company de laboratori Héctor Gaitán.

Els registres realitzats mostraven que el fet de coexpressar zGlialCAMa juntament amb rCLC-2 en els oòcits produïa una rectificació del canal tal i com es mostrava en els experiments de (Jeworutzki et al., 2012). Les corrents de CLC-2 juntament amb zGlialCAMa mostraven que hi havia una activació a potencials positius. En canvi, quan el canal es coexpressava amb zGlialCAMb no s'observaven canvis, les traces obtingudes eren molt

similars a les que es donen quan el canal es troba sense interaccionar amb GliaCAM (Figura 93).

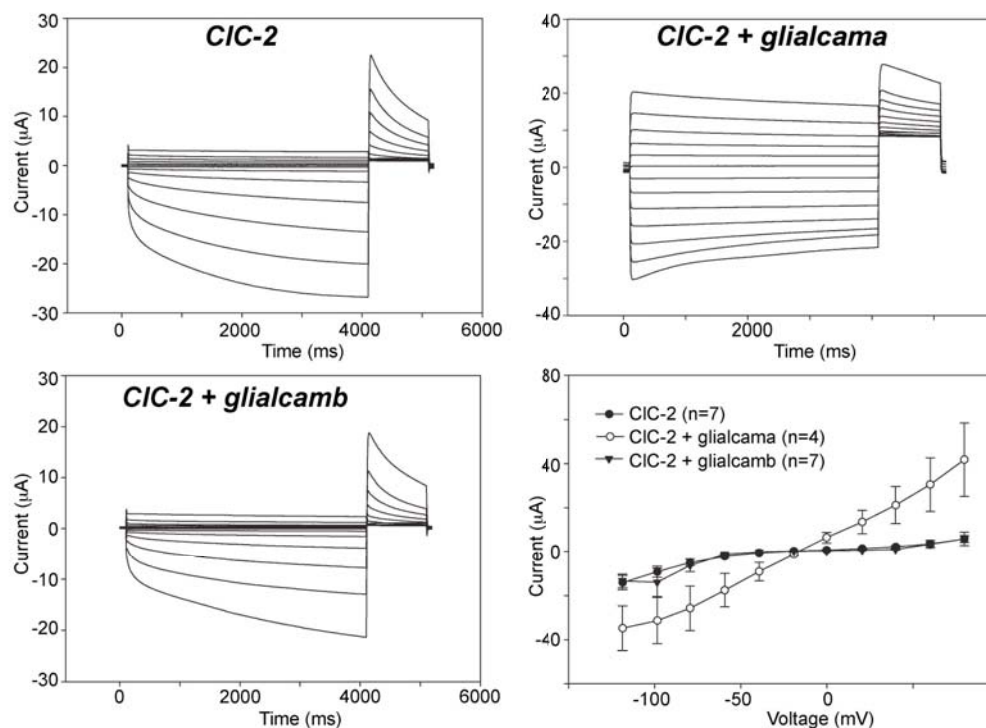


Figura 93. Mesura de l'activitat CIC-2 en oòcits de *Xenopus* amb presència de zGliaCAMa i zGliaCAMb. Registres representatius de les corrents de clorur quan el canal es troba sol, o amb presència de zGliaCAMa i zGliaCAMb. Dades corresponents a: CIC-2 (n=7 cèl·lules analitzades); CIC-2+zGliaCAMa (n=4 cèl·lules analitzades); CIC-2+zGliaCAMb (n=7 cèl·lules analitzades).

Per tant zGliaCAMa en aquest cas també mostrava el mateix comportament sobre CIC-2 canviant les seves propietats de canal de la mateixa manera que s'havia observat anteriorment amb els astròcits de rata.

3. ESTUDIS DE LA LOCALITZACIÓ DE zMLC1 I zGliaCAMa EN EL CERVELL DEL PEIX ZEBRA KNOCK-OUT

Amb col·laboració amb la Dra. Mónica Folgueira de la Universitat de la Coruña es van dur a terme experiments de localització de zMLC1 i zGliaCAMa en teixits del peix zebra *knock-out*.

L'objectiu era saber si també en aquest cas l'absència de zMLC1 afectaria a la localització de zGlialCAMa, tal i com s'havia observat en el cerebel del ratolí *knock-out* i en el de la pacient (Hoegg-Beiler et al., 2014; Sirisi et al., 2014).

Es va analitzar el cervell del peix zebra i es va observar la presència de la proteïna zMLC1 en el teixit *wild-type*, just en la regió de la superfície ventricular i pial del còrtex. També es detectava la proteïna en els astròcits situats al voltant del vasos sanguinis. En el cas del teixit del peix *knock-out* no es va observar cap marca amb l'anticòs contra zMLC1 indicant que aquests resultats eren específics (Figura 94 A).

Mitjançant immunofluorescència també es va analitzar la retina del peix zebra. En aquest cas s'observava una alta expressió de la proteïna zMLC1 en la membrana interna de la retina en el teixit del *wild-type*, principalment en els peus astrocitaris de la glia de Müller i en la glia radial. En canvi, en el teixit del *knock-out* no es va observar cap marcatge (Figura 94 B), confirmant que la proteïna es trobava absent en aquesta localització.

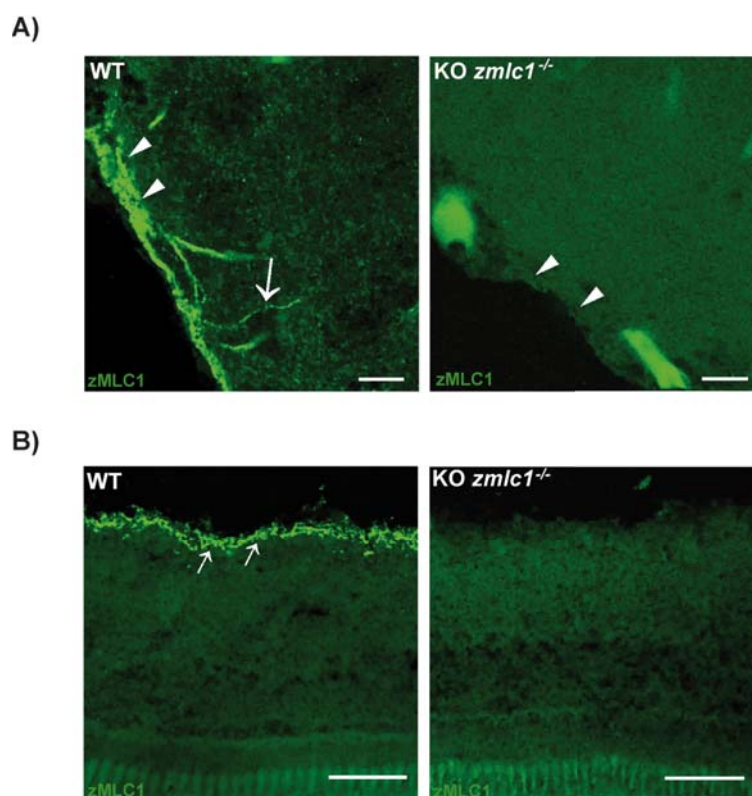


Figura 94. Estudis de localització de la proteïna zMLC1 en el cervell i en la retina del peix zebra. A) Localització de zMLC1 en el cervell del peix zebra del *wild-type* (còrtex i vasos sanguinis, fletxes) i absència de ZMLC1 en el cervell del *knock-out*. B) Localització de zMLC1 en la glia de Müller i en la glia radial en la retina del peix zebra del *wild-type* (membrana interna, fletxes) i absència de zMLC1 en la retina del *knock-out*. S'utilitza l'anticòs zMLC1. Barra: 100 μ m.

Paral·lelament també es van realitzar estudis de localització per la proteïna zGliaCAMa en aquests mateixos teixits del peix zebra. En el cervell del peix *wild-type* es va observar una marca similar a l'observada anteriorment per zMLC1. zGliaCAMa es localitzava principalment en els cossos gials i en els astròcits situats al voltant d'alguns vasos sanguinis. En canvi, en el teixit del peix *knock-out* s'observava una localització difusa de la proteïna zGliaCAMa (Figura 95 A). Aquests resultats mostraven el mateix que s'havia observat en el teixit del ratolí *knock-out* (Hoegg-Beiler et al., 2014) i en el teixit del pacient estudiat (Sirisi et al., 2014) indicant que zGliaCAM es veia afectada per la manca de zMLC1.

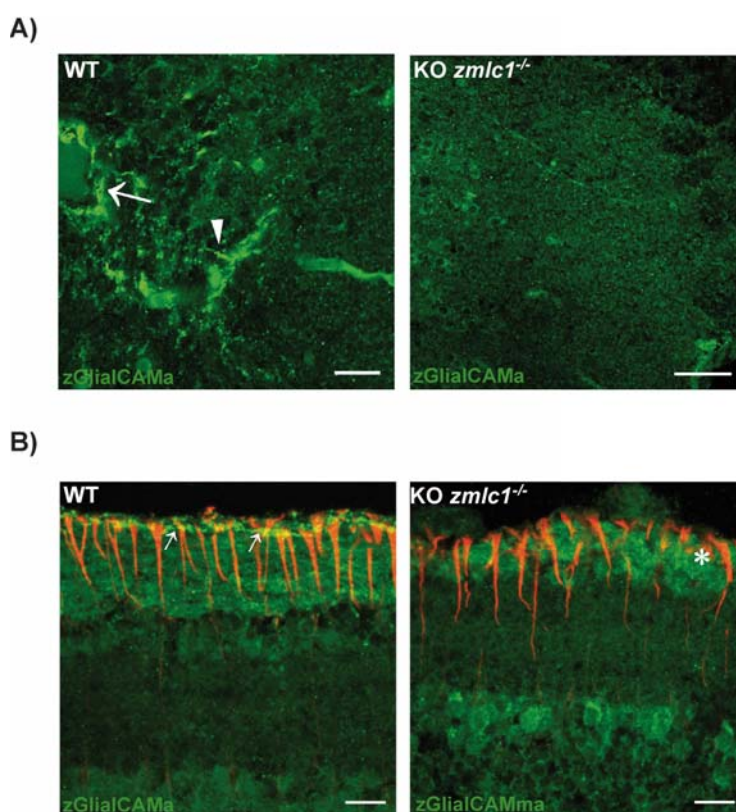


Figura 95. Estudis de localització de la proteïna zGliaCAMa en el cervell i en la retina del peix zebra. A) Localització de zGliaCAMa en el cervell (vasos sanguinis, fletxes) del peix zebra del *wild-type* i deslocalització per part de zGliaCAMa en el cervell del *knock-out*. B) Colocalització de zGliaCAMa i GFAP en els peus astrocitaris de la glia de Müller en la retina del peix zebra del *wild-type* i deslocalització (asteriscs) per part de zGliaCAMa en la retina del *knock-out*. S'utilitza l'anticòs contra zGliaCAMa. Barra en A: 50 μm . Barra en B: 20 μm .

La proteïna zGliaCAMa també va ser analitzada en la retina del peix zebra. De la mateixa manera que s'havia observat amb la proteïna zMLC1, zGliaCAMa es trobava principalment localitzada a la capa interna de la retina en el teixit del peix *wild-type*, en el peus astrocitaris

de la glia de Müller. En el teixit del peix *knock-out* la proteïna zGlialCAMa també s'observava deslocalitzada (Figura 95 B).

4. ESTUDI DEL FENOTIP VACUOLITZANT MITJANÇANT ESTUDIS DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA D'IMATGE (MRI)

Es van realitzar estudis de MRI en el model de peix zebra per tal de saber si en aquesta espècie també existia algun tipus de fenotip similar al que s'havia observat anteriorment amb el model de ratolí i amb els humans. Aquests experiments es van realitzar amb col·laboració amb la Dra. Alia A (Universitat de Leiden).

Els estudis es van realitzar en animals adults (14 mesos) i només es van poder observar petites lesions localitzades en el telencèfal i en el mesencèfal (Figura 96 A). De la mateixa manera que en el ratolí, també es va mesurar l'àrea del telencèfal respecte l'àrea total per saber si en aquest cas l'animal també presentava macrocefàlia. Els resultats van mostrar que l'àrea del telencèfal mesurada era major en l'animal *knock-out* respecte el *wild-type*, indicant que en aquest cas també hi havia un increment dels fluids en aquestes cavitats (Figura 96 B).

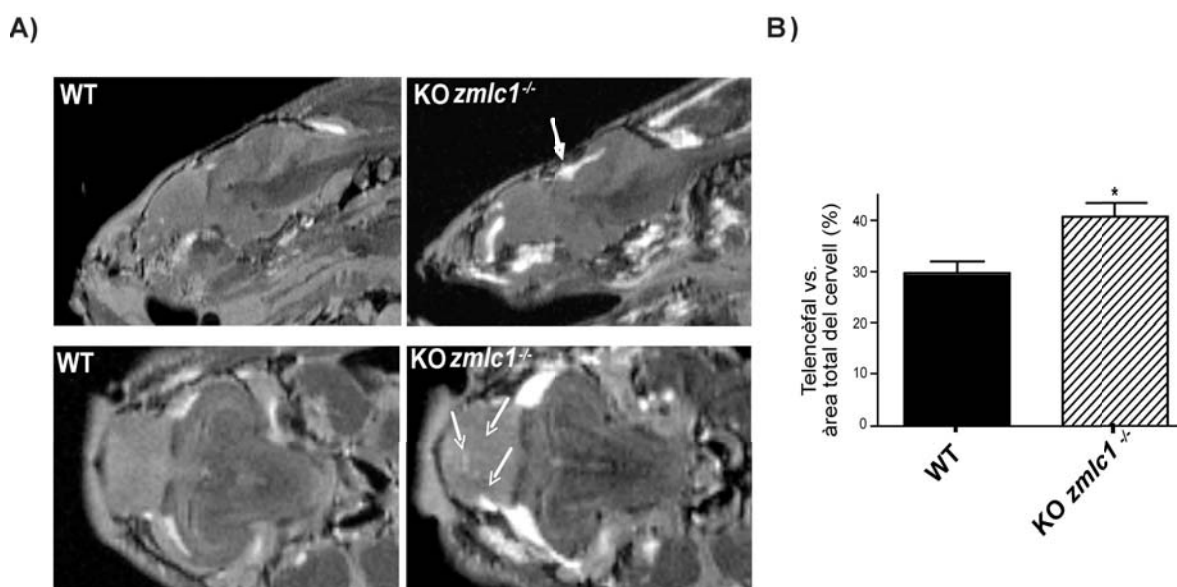


Figura 96. Presència del fenotip vacuolitzant observat mitjançant imatges de MRI en el peix zebra *knock-out*. A) Imatges T2 obtingudes per MRI en animals *wild-type* i *knock-out* on s'observaven intensitats en el telencèfal i mesencèfal (fletxes). B) Mesura de l'àrea del telencèfal respecte l'àrea total del cervell representada en %. WT (*wild-type*)=4; n: KO (*knock-out*)=4. Estadística: * $p < 0,05$ *t*-Student no aparellada.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ GENERAL

Durant la realització d'aquesta Tesi s'han obtingut resultats importants que han permès avançar i ampliar els coneixements sobre la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC), gràcies a la utilització de diferents models animals i cel·lulars.

- **La fisiopatologia de la leucodistrofia MLC**

MLC és una malaltia rara associada a la substància blanca. La seva incidència en la població és baixa, la qual cosa dificulta el seu estudi. Per tal de poder avançar en la seva recerca s'ha generat, per primer cop, un model de ratolí *knock-out* per *Mlc1*, primer gen associat a la malaltia. Aquest model animal ha permès estudiar les característiques principals de la fisiopatologia observades en els pacients, demostrar que MLC1 és únicament una proteïna astrocitària i que la seva localització a les neurones i a les cèl·lules endodurals, descrita anteriorment en el grup (Teijido et al., 2004, 2007), és inespecífica. Amb aquests resultats es deixen enrere les controvèrsies sobre la localització cel·lular de la proteïna. Així doncs, la proteïna MLC1 en el ratolí es troba principalment en astròcits perivasculars i en els astròcits situats en els processos apicals de la glia de Bergmann.

El gen *MLC1* està present només en espècies que produeixen mielina, indicant que MLC1 podria tenir un rol important en la fisiologia del cervell quan la mielina hi és present o en el desenvolupament d'aquesta. En els humans, el procés de mielinització es dona a partir del primer any de vida i després es va estabilitzant fins aproximadament als 4 anys. Els pacients que pateixen la malaltia MLC, presenten una progressiva megalencefàlia principalment durant els primers mesos d'edat donant lloc a una substància blanca difusa i la generació d'edema a diferents regions del cervell, de manera més prominent en el còrtex, i seguidament en el cerebel. A més, els pacients desenvolupen macrocefàlia, la qual s'estabilitza posteriorment (van der Knaap et al., 1995b), i mostren la presència de quists principalment a la regió anterior-temporal (van der Knaap et al., 2012).

El model *Mlc1 knock-out* de ratolí ha permès observar el fenotip vacuolitzant corresponent a la malaltia mitjançant estudis de microscòpia electrònica i MRI. El fenotip sorgeix quan el ratolí ja es considera adult (al voltant dels 3 mesos d'edat). La diferència de temps en què apareixen els primers signes de la malaltia entre els humans i els ratolins es pot deure als diferents patrons de mielinització que segueixen aquestes espècies. Mitjançant la MRI s'han observat hiperintensitats en la substància blanca del cerebel indicant una possible acumulació de fluids en aquesta regió. El fet d'observar en el ratolí únicament la substància blanca del cerebel difusa podria ser conseqüència que en aquesta regió, aquesta espècie

presenta una major quantitat de la proteïna MLC1. A part, els estudis realitzats en el cerebel del *knock-out* mitjançant microscòpia electrònica i estudis realitzats a partir d'un cultiu d'astròcits provinents del *knock-out*, han mostrat que la vacuolització es produeix tant a nivell de la mielina com a nivell astrocitari, tal com s'havia descrit anteriorment gràcies a l'anàlisi de la biòpsia d'un pacient amb MLC (Duarri et al., 2011; van der Knaap et al., 1996). El fenotip vacuolitzant observat en el ratolí va augmentant amb el temps, ja que en edats més avançades (12-13 mesos) els animals mostren majors hiperintensitats en la substància blanca del cerebel que en edats anteriors. Aquesta vacuolització en el cerebel és similar a la que s'havia observat anteriorment en el ratolí *knock-out* per al gen *Clcn2* però amb un desenvolupament més lent i de manera menys severa (Blanz et al., 2007).

Una diferència amb els humans és que el model de ratolí no presenta macrocefàlia aparent tot i observar hiperintensitats en el cerebel. Mitjançant un anàlisi acurat de les imatges de MRI s'ha pogut demostrar que els animals *knock-out* tenen un volum significativament més gran. Aquest augment de volum estaria indicant que aquests animals estan acumulant aigua en les seves cavitats, possiblement en forma de vacuoles, de la mateixa manera que s'ha observat en els pacients.

Tot i que el ratolí *knock-out* presenta un fenotip vacuolitzant en la substància blanca del cerebel i macrocefàlia, aquest no presenta quists subcorticals. Aquest fet es podria deure a què el model de ratolí generat no es troba suficientment danyat perquè s'arribin a generar els quists, possiblement com s'observa en l'etapa de la infantesa en els humans (van der Knaap et al., 2012).

Una altra característica típica dels pacients amb MLC és que acostumen a presentar disfuncions neurològiques al llarg de la malaltia. Les persones que pateixen la leucodistròfia MLC acostumen a mostrar un deteriorament de les funcions motores a diferents graus. Els potencials evocats auditius són normals i els potencials evocats visuals es van deteriorant amb el temps (van der Knaap et al., 1995b, 2012). Els estudis realitzats amb el ratolí *knock-out* no mostren cap tipus de deteriorament de les funcions motores, i els potencials evocats auditius i els electroretinogrames no es veuen alterats per la deficiència de la proteïna MLC1. Podria ser que el model de ratolí *knock-out* per *Mlc1* presentés danys en els nervis auditius i visuals a edats molt avançades, de la mateixa manera que passa en altres leucodistròfies, en que els animals presente un fenotip característic a llarg temps (Pujol, 2002), o que fins i tot, no arribin a mostrar danys a nivell d'aquests nervis perquè el ratolí no desenvolupa el mateix grau de severitat de la malaltia que en humans.

Considerant tot el que s'ha esmentat anteriorment es podria concloure que el model de ratolí *knock-out* per *Mlc1* generat, presenta les característiques típiques de les primeres etapes de la malaltia i possiblement per aquest fet no es pot observar en el ratolí un fenotip tan sever com el que presenten els humans.

MLC és una malaltia amb heterogeneïtat de locus, així mutacions en el gen *GLIALCAM* també provoquen el desenvolupament d'aquesta (López-Hernández et al., 2011a). Recentment, també s'ha descrit un model de ratolí *knock-out* per al gen *GlialCAM*. Aquest model també mostra una vacuolització localitzada en el cerebel que augmenta amb el temps, amb un patró molt similar a la que s'ha observat amb el model *knock-out* de *Mlc1* (Hoegg-Beiler et al., 2014). Aquest animal deficient en *GlialCAM* tampoc presenta disfuncions motores.

Una altra eina generada per a l'estudi de la malaltia MLC ha estat el desenvolupament del model *knock-out* de peix zebra. Tot i els avantatges que aporta aquest nou model, no s'ha pogut observar un fenotip vacuolitzant i els estudis de MRI mostren poc danyada la substància blanca del peix. Aquesta diferència es podria deure a que aquest model també presenta un patró de mielinització diferent, de la mateixa manera que s'ha observat entre els humans i els ratolins (van der Knaap et al., 2012). A part, es coneix que el peix zebra adult té els elements necessaris per a dur a terme una regeneració neuronal i té capacitats de reparació després d'una lesió (Chapouton et al., 2007; Kyritsis et al., 2012). Segurament el fet que aquesta espècie tingui una maquinària de reparació evita que es pugui observar el fenotip característic de la leucodistrofia MLC en aquesta espècie.

- **Bioquímica de la fisiopatologia de la MLC**

Durant els primers mesos de la caracterització del ratolí *knock-out*, el nostre grup va descriure *GLIALCAM* com a segon gen associat a la malaltia MLC (López-Hernández et al., 2011a). Posteriorment també es va descriure que *GlialCAM* era subunitat auxiliar del canal de Cl⁻ CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012). D'altra banda, el model *knock-out* de CIC-2 mostrava un increment d'aigua en la substància blanca del cervell amb formació de vacuoles a les làmines externes de la mielina, similars a les que s'observen en els pacients amb MLC (Blanz et al., 2007). Aquest conjunt de dades van fer pensar una possible implicació de CIC-2 en la malaltia tot i no haver trobat mutacions de CIC-2 en pacients amb característiques de MLC, i que CIC-2 i MLC1 no interaccionen de manera directa (Duarri et al., 2011; Scheper et al., 2010). Estudis anteriors a la generació del ratolí *knock-out* realitzats a partir dels models astrocitaris *knock-down* de MLC1 i *GlialCAM*, generats per RNAi, indicaven que la deficiència de la proteïna MLC1 no afectava ni a la localització ni als nivells d'expressió de

GlialCAM. Per altra banda, la deficiència de GlialCAM disminuïa els nivells d'expressió de MLC1 i modificava la localització d'aquesta quedant retinuda de manera intracel·lular (Capdevila-Nortes et al., 2013), però l'absència de GlialCAM no comportava canvis ni en la localització ni en els nivells d'expressió de CIC-2 (dades no publicades).

Així doncs, s'han estudiat les proteïnes GlialCAM i CIC-2 a nivell tissular en el ratolí *knock-out* per tal de saber si realment la manca de MLC1 generava algun defecte sobre aquestes proteïnes. Gràcies al ratolí *knock-out* s'ha observat que GlialCAM i CIC-2 es troben alterades per la deficiència de MLC1. Els nivells d'expressió de GlialCAM no es veuen alterats ni en el cervell ni en el cerebel. En canvi, els nivells d'expressió de CIC-2 es mostren disminuïts un 50% en el cerebel. Aquesta disminució de CIC-2 podria estar indicant que la proteïna s'estaria degradant. A més, aquestes dues proteïnes mostren una localització defectiva, principalment en els processos apicals de la glia de Bergmann. GlialCAM i CIC-2 no es troben en la seva localització habitual observant una marca difusa i desordenada de les proteïnes. En els vasos sanguinis de diferents regions del cervell, en canvi, té lloc una deslocalització parcial, donat que no tots els astròcits situats en aquesta localització semblen estar afectats per la pèrdua de MLC1. També s'ha observat que l'absència de MLC1, fa que GlialCAM i CIC-2 es trobin deslocalitzades en els somes dels oligodendròcits essent incapaces de formar *clusters*. Tots aquests resultats fan pensar que CIC-2 podria tenir un paper important en la malaltia degut a la seva relació directa amb GlialCAM.

A més a més, estudis realitzats pel grup del Dr. Thomas Jentsch amb el model *knock-out* de *GlialCAM* també presenten, una disminució dels nivells d'expressió de CIC-2 i de MLC1, una deslocalització d'aquestes dues proteïnes en la glia de Bergmann i una deslocalització de CIC-2 en els oligodendròcits. El fet d'observar que la manca de GlialCAM disminueix els nivells d'expressió i deslocalitza a MLC1, i que els dos models generats de la malaltia mostren un fenotip vacuolitzant molt semblant, podria explicar perquè pacients que presenten el fenotip MLC1 i els que presenten el fenotip MLC2A mostren les mateixes característiques fenotípiques. El fet de que la proteïna CIC-2 es vegi afectada en els dos ratolins *knock-out* vindria donat pel defecte observat en GlialCAM, ja que CIC-2 no interacciona amb MLC1.

Les dades obtingudes amb el ratolí *knock-out* de *Mlc1* s'han pogut corroborar gràcies a una mostra humana en què s'ha observat que una mutació concreta de la proteïna MLC1 presentada per una pacient, dona lloc a la deslocalització de GlialCAM en la glia de Bergmann. En el cas de CIC-2, tot i que sembla existir una certa deslocalització de la proteïna també en el pacient, els resultats no són clars del tot i es necessitaria comprovar amb alguna altra mostra de teixit humana. Així doncs, contràriament als estudis descrits

anteriorment *in vitro*, en que es mostra que el tràfic de GlialCAM és independent de MLC1 (López-Hernández et al., 2011b), els estudis realitzats amb el ratolí *knock-out* i amb el teixit de la pacient demostren que, MLC1 és necessària per a la localització i l'estabilització de GlialCAM a la membrana cel·lular.

Els estudis realitzats amb el model *knock-out* de *zmlc1* en peix zebra han generat resultats similars en que s'observa que la deficiència de zMLC1 també dóna lloc a una deslocalització per part de zGlialCAMa en la glia radial i en els peus astrocitaris de la glia de Müller de l'animal. Per tant, gràcies a aquest model es torna a demostrar que la localització de GlialCAM no és independent de MLC1. A més, la relació entre MLC1 i GlialCAM per la seva correcta localització es troba conservada al llarg de l'evolució.

D'altra banda gràcies al ratolí *knock-out* de *Mlc1* s'ha pogut observar que, tot i que MLC1 i CIC-2 no interaccionen de manera directa, estan relacionades mitjançant GlialCAM. Estudis d'electrofisiologia realitzats en el teixit del ratolí han demostrat que tot i que GlialCAM i CIC-2, s'expressen en la glia de Bergmann, en aquestes cèl·lules l'activitat del canal CIC-2 no està modificada per GlialCAM. En canvi, en els oligodendròcits s'observen les corrents típiques de quan es sobreexpressa GlialCAM. És en els astròcits d'aquesta regió del ratolí *knock-out* on s'observa el principal defecte funcional del canal CIC-2, ja que les corrents disminueixen i es mostren com si GlialCAM no hi fos. Aquests resultats indiquen que el defecte principal de CIC-2 es troba en els oligodendròcits, les cèl·lules principals afectades per la vacuolització en la leucodistrofia MLC. Aquest fet podria estar indicant que el defecte observat en el canal de Cl⁻ CIC-2, podria contribuir a un defecte en l'homeòstasi iònica, ja que s'ha hipotetitzat que CIC-2 podria tenir un paper important en la compensació de càrregues durant l'entrada i sortida de K⁺ en les cèl·lules glials (Blanz et al., 2007).

També s'ha hipotetitzat que el defecte observat en els oligodendròcits podria venir donat per la relació estequiomètrica entre GlialCAM i CIC-2. Podria ser que una molècula de GlialCAM fos capaç de portar i d'estabilitzar a CIC-2 a les unions cel·lulars, tal com s'observa en la glia de Bergmann. En canvi, dues molècules de GlialCAM podrien donar lloc al canvi de les propietats del canal, com s'observa en els oligodendròcits. Podria ser que CIC-2 en la glia de Bergmann només es trobés ancorada a una molècula de GlialCAM ja que en aquesta localització també hi ha MLC1 i que, per tant, en aquest tipus cel·lular existís certa competència entre MLC1 i CIC-2 per mantenir-se unides a GlialCAM.

Una possible explicació per explicar el defecte bioquímic de GlialCAM i CIC-2 observat *in vivo* podria ser el següent: per una banda s'ha demostrat que MLC1 és una proteïna únicament astrocitària. En canvi, GlialCAM i CIC-2 són proteïnes que es troben en els

astròcits i en els oligodendròcits. Per altra banda, estudis recents (Hoegg-Beiler et al., 2014) i estudis preliminars del nostre grup (dades no publicades) mostren que GlialCAM pot formar interaccions homofíliques en *cis* i interaccions en *trans* amb ella mateixa o amb altres proteïnes mitjançant els dominis Ig. A part, s'ha demostrat que mutacions en GlialCAM en els dominis Ig's afecten a la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars i consegüentment també s'afecta la localització de MLC1 i CIC-2 a les unions cel·lulars (Jeworutzki et al., 2012).

Per tant quan MLC1 no hi és, GlialCAM és inestable, ja que com no pot mantenir la seva localització de manera correcta i no pot formar interacció amb una altre GlialCAM que estigui associada a CIC-2, i en conseqüència, desestabilitza a CIC-2. Podria ser que aquest fet es donés lloc entre astròcits i entre un astròcit i un oligodendròcit.

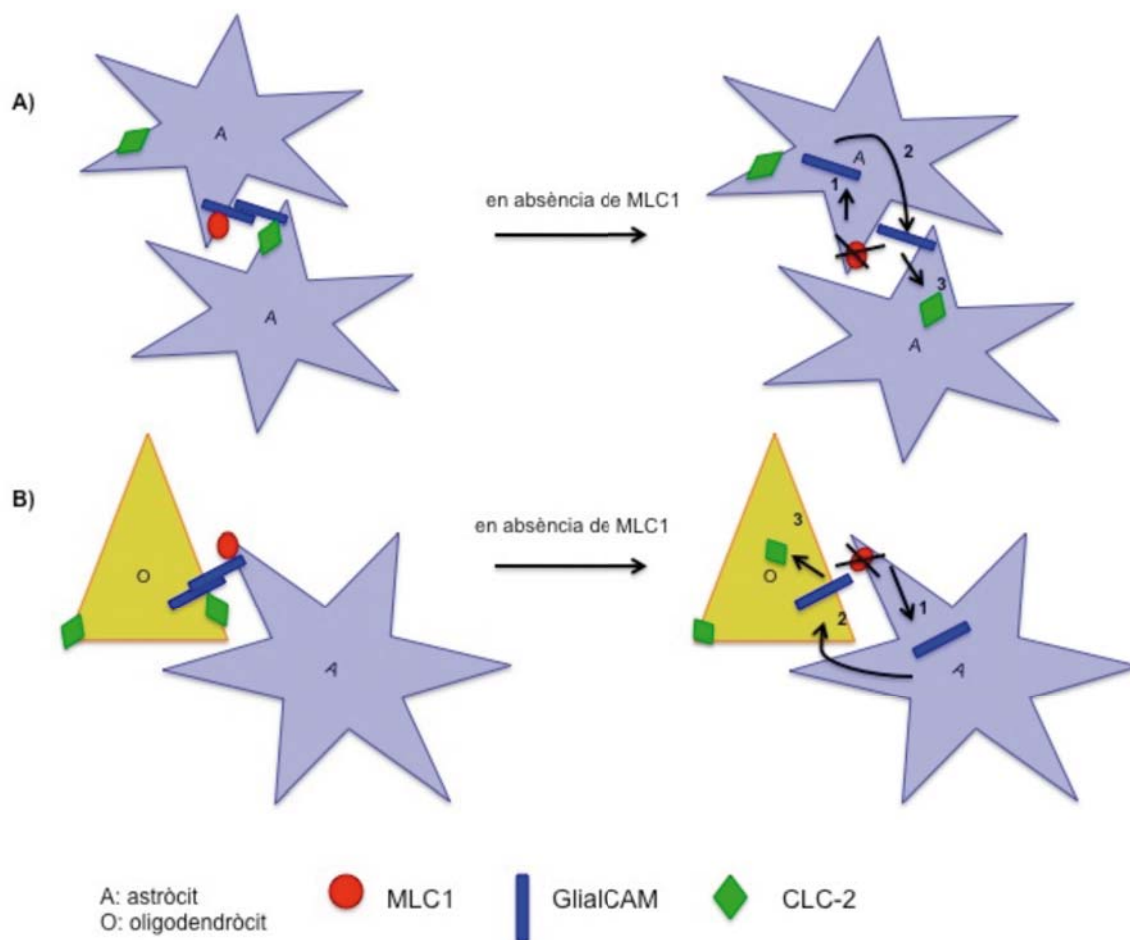


Figura 97. Model bioquímic *in vivo* proposat en absència de MLC1 entre astròcits (A) i entre astròcit-oligodendròcit (B). 1) La falta de MLC1 fa que GlialCAM es desestabilitzi en determinades situacions fisiològiques 2) GlialCAM es deslocalitza i s'internalitza impedit la formació d'interaccions amb altres molècules de GlialCAM. 3) GlialCAM és incapaç de localitzar a CIC-2 a les unions cel·lulars fent que també quedi deslocalitzada.

En resum, es podria dir que *in vivo*, GlialCAM requereix de MLC1 per mantenir una correcta localització a la membrana cel·lular i que el complex MLC1/GlialCAM estableix a CIC-2 també en aquesta localització. L'absència de MLC1 fa que GlialCAM es desestabilitzi i per això es troba deslocalitzada, principalment en el cerebel, i aquesta deslocalització segurament porti a la conseqüent deslocalització i possible degradació de CIC-2. Amb l'estudi bioquímic realitzat a partir del model de ratolí *knock-out*, el model de peix zebra *knock-out* i amb la mostra de la pacient es pot concloure que la manca de la proteïna MLC1 és la causa bioquímica de la malaltia donant lloc al fenotip MLC.

Contràriament a aquests resultats, estudis realitzats amb els astròcits del ratolí *knock-out*, han mostrat un cop més que la localització *in vitro* de GlialCAM és independent de MLC1 ja que aquesta és capaç de localitzar-se correctament a les unions cel·lulars. Només s'ha observat que GlialCAM i CIC-2 es localitzaven defectuosament en absència de MLC1 quan es troben en un medi amb alt contingut de K^+ , imitant condicions d'activitat neuronal. Podria ser que *in vitro* manqués alguna o algunes molècules que poguessin intervenir en la deslocalització observada *in vivo* d'aquestes proteïnes.

- **Relació bioquímica cel·lular entre MLC1, GlialCAM i CIC-2**

En el grup es va identificar *GLIALCAM* com a segon gen de la malaltia MLC (López-Hernández et al., 2011a) i es va descriure que la proteïna GlialCAM actuava com a subunitat β de MLC1, interaccionant directament i dirigint-la a les unions cel·lulars. La proteïna MLC1 en condicions normals és troba localitzada a la membrana cel·lular, però quan es troba mutada presenta una disminució dels seus nivells i la seva localització s'observa de manera intracel·lular, quedant retinguda en el reticle endoplasmàtic (Duarri et al., 2008). Estudis *in vitro* de la coexpressió, juntament amb GlialCAM, de la variant mutada S69L presentada per la pacient i altres mutacions descrites anteriorment en *MLC1*, demostren que GlialCAM és capaç de protegir aquestes mutacions de la degradació per retenció en el reticle endoplasmàtic, millorant la seva estabilitat, i essent capaç de localitzar-les a les unions cel·lulars. Aquestes dades, juntament amb les obtingudes anteriorment mitjançant estudis de les mutacions en *MLC1* amb els models *knock-down* de *MLC1* i de *GlialCAM* (Capdevila-Nortes et al., 2013), indiquen que GlialCAM actua com a xaperona de *MLC1*.

Els estudis realitzats amb el model *knock-out* de peix zebra han demostrat que el rol de GlialCAM com a subunitat β de *MLC1* es conserva entre espècies, ja que la proteïna zGlialCAMa, *in vitro* també es capaç de localitzar a zMLC1 a les unions cel·lulars. Posteriorment a la funció de GlialCAM com a subunitat β de *MLC1* també es va descriure GlialCAM com a subunitat auxiliar del canal de Cl^- CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012), amb la

que també interaccionava de manera directa i era capaç de localitzar-la a les unions cel·lulars. Aquest rol també s'ha vist conservat entre espècies ja que l'ortòleg de GlialCAM en peix zebra, zGlialCAMa, *in vitro* també es capaç de localitzar a rCIC-2 a les unions cel·lulars i de modificar les propietats del canal. Aquests resultats indiquen que zGlialCAMa podria executar la mateixa funció fisiològica que GlialCAM.

S'han descrit mutacions recessives i dominants en el gen *GLIALCAM* (López-Hernández et al., 2011a). No obstant, no se sap perquè algunes mutacions es comporten com a dominants i altres com a recessives i si tenen diferents propietats bioquímiques. Recentment, en el grup s'ha establert una classificació d'aquestes mutacions segons el seu comportament en astròcits de rata i en astròcits del ratolí *knock-out* (dades no publicades).

Estudis preliminars de mutacions dominants i recessives realitzats en oligodendròcits de rata mostren que la majoria d'aquestes tenen un defecte en el tràfic. Existeixen però dues variants, K135Del i D211N, que no mostren cap defecte sinó que fins i tot semblen tenir un comportament millor que la proteïna *wild-type*. S'hipotetitza que el defecte d'aquestes mutacions podria observar-se en el comportament del canal CIC-2. Podria ser que GlialCAM tot i mantenir-se localitzada a la membrana no fos capaç d'acoplar-se a CIC-2 i aquesta no pogués arribar a la membrana cel·lular. Actualment en el grup s'estan duent a terme nous experiments per tal de poder concretar millor el comportament d'aquestes mutacions i quin és el defecte de les mutacions que semblen comportar-se com la proteïna *wild-type*.

S'han estudiat tres variants dominants en peix zebra. Aquestes mutacions presenten, de la mateixa manera que s'havia observat amb les variants humanes (López-Hernández et al., 2011b), un defecte en el tràfic cap les unions cel·lulars sense interferir en els nivells d'expressió de la proteïna. Un cop més, es demostra que el comportament de la proteïna zGlialCAMa, ortòleg de GlialCAM, es conserva entre espècies.

- **Rol fisiològic de la proteïna MLC1**

Anteriorment s'havia suggerit que MLC1 podia tenir una funció de canal o de transportador (Teijido et al., 2004) però estudis posteriors en el grup van demostrar que aquest no era el seu rol. Estudis més recents mitjançant els models *knock-down* de MLC1 i GlialCAM havien mostrat una disminució de l'activitat VRAC indicant que MLC1 podria ser un component o un regulador d'aquesta activitat (Capdevila-Nortes et al., 2013), però gràcies als astròcits del *knock-out* s'ha pogut esbrinar que realment MLC1 afecta l'activitat VRAC de manera indirecta. A part, recentment s'ha descrit la molècula encarregada de la modulació d'aquestes corrents de Cl⁻, les proteïnes LRRC8 i principalment la seva isoforma LRRC8A

(Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). Aquesta molècula guarda certa similitud amb les pannexines, les quals formen unions de tipus *gap*. Podria ser que el complex MLC1/GlialCAM estigués d'alguna manera modulant l'activitat VRAC i per aquesta raó en absència d'aquestes proteïnes les corrents de Cl⁻ mediades per VRAC es trobessin disminuïdes. Aquesta disminució de l'activitat VRAC d'alguna manera podria generar un defecte en el mecanisme RVD donant lloc a una acumulació d'aigua intracel·lular. Actualment en el laboratori s'ha començat una línia d'investigació sobre la relació funcional entre LRRC8 i MLC1/GlialCAM.

També s'hipotetitza que MLC1 podria desenvolupar, juntament amb GlialCAM i CIC-2, un rol fisiològic en el procés de sifoneig de K⁺. Els estudis realitzats mitjançant la utilització d'astròcits i d'oligodendròcits de rata han demostrat que el canal CIC-2 en condicions d'alt contingut de K⁺ es capaç de localitzar-se a la membrana cel·lular. En el procés de sifoneig de K⁺ es coneix que estan implicades diverses proteïnes com són les Cx32 i Cx47, l'AQP4 i el canal de K⁺ *inward rectifier* Kir4.1 (Benfenati and Ferroni, 2010; Rash, 2010), i s'ha descrit que l'absència de Kir 4.1 o de les connexines 32 i 47 donen lloc a una acumulació d'aigua a la mielina (Menichella et al., 2006; Neusch et al., 2001).

D'alguna manera GlialCAM, que és una proteïna de membrana, mitjançant un mecanisme que es desconeix recull a CIC-2, que en condicions normals sembla estar localitzat en el Golgi (dades no publicades), i el porta a la membrana, i en aquella localització el canal canvia les seves propietats de canal donant lloc a una entrada de Cl⁻. A banda, estudis d'electrofisiologia realitzats en els astròcits de rata incubats amb el medi amb alt contingut de K⁺ mostren unes traces molts semblants a les que s'observen quan se sobreexpressa GlialCAM, indicant que aquesta condició és la que fa canviar la localització de CIC-2 donant lloc a canvis en les seves propietats de rectificació i d'activació (dades no publicades). Els resultats obtinguts mitjançant les cèl·lules glials de rata, els astròcits del *knock-out*, els estudis amb el teixit del *knock-out* i els estudis descrits recentment en que es mostra que mutacions en el gen *CLCN2* donen lloc a leucodistrofia (Depienne et al., 2013) suggereixen que CIC-2 podria ser necessària per a la regulació de la concentració de K⁺ en l'espai extracel·lular durant l'activitat neuronal, permetent una entrada d'ions Cl⁻ a la cèl·lula.

Tot i els resultats obtinguts fins al moment, no s'ha pogut descriure la funció de MLC1. En aquest treball s'hipotetitza que MLC1 podria formar part d'un macrocomplex proteic en els peus astrocitaris involucrat en l'homeòstasi d'ions o fluids de l'espai extracel·lular. MLC1 podria encarregar-se del control i de la localització de GlialCAM a la superfície cel·lular en certes condicions fisiològiques. A la vegada GlialCAM s'encarregaria de portar a CIC-2 a les

membranes cel·lulars en condicions, com podria ser durant l'activitat neuronal, canviant les propietats del canal (Figura 98, procés 1). L'absència de MLC1 fa que GlialCAM i CIC-2 es trobin deslocalitzades i aquest fet podria donar lloc a una mala translocació d'ions.

També podria ser que MLC1 actués com a sensor de certes condicions cel·lulars i extracel·lulars o bé podria estar activant alguna molècula necessària per a la regulació del volum cel·lular, com per exemple VRAC, mitjançant alguna molècula efectora o a partir d'algun estímul concret (Figura 98, procés 2). L'activació de VRAC sempre va acompanyada de la sortida d'aigua, podria ser que la disminució de VRAC observada en els models *knock-down* i en els astròcits del *knock-out* generés una acumulació d'aigua intracel·lular i un defecte en el mecanisme de RVD.

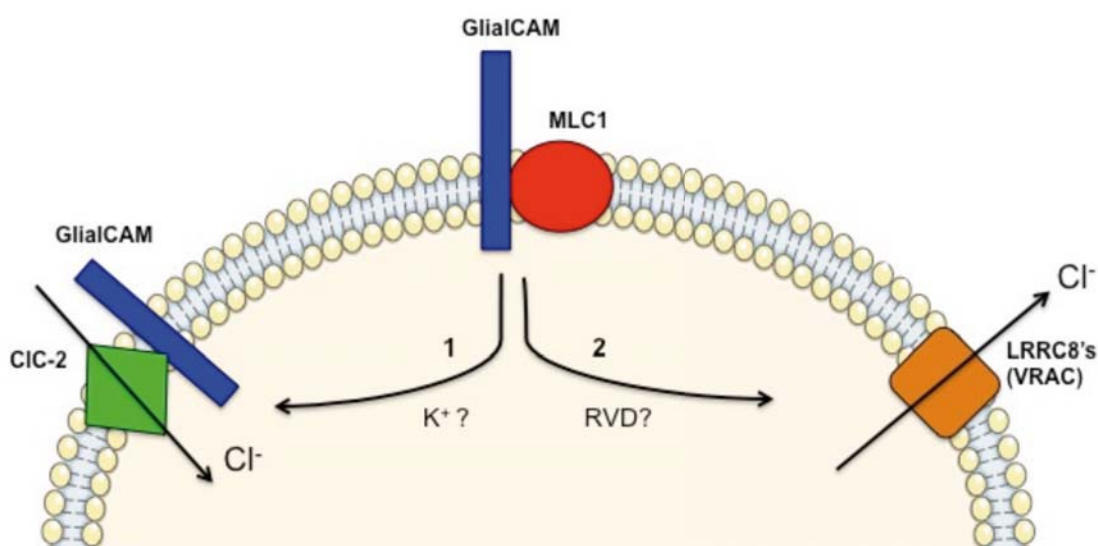


Figura 98. Model representatiu de les possibles funcions de MLC1. 1) MLC1 podria encarregar-se del control de GlialCAM i conseqüentment de CIC-2 a la superfície cel·lular en determinades condicions fisiològiques. 2) MLC1 juntament amb GlialCAM podrien actuar com a molècules sensors o activadores de processos relacionats amb la regulació del volum mitjançant molècules efectoras desconegudes.

- **Tractament per a la fisiopatologia MLC**

Desafortunadament encara avui dia es desconeix la funció de la proteïna MLC1 i el mecanisme patològic de la malaltia. Per aquesta raó encara no s'han pogut desenvolupar teràpies efectives per als pacients. Els models animals utilitzats en aquest treball són els primers que s'han descrit per a l'estudi de la malaltia MLC. Si es compara amb tots els models generats amb altres leucodistròfies com són Krabbe, Canavan, Alexander, Pelizaeus-Merzbacher o l'Adrenoleucodistròfia i els estudis realitzats amb aquests, es podria

dir que queda un llarg camí per recórrer en la recerca de la MLC.

En base als resultats obtinguts amb aquest treball l'objectiu principal seria tractar els pacients en etapes inicials de la malaltia quan aquests mostren megalencefàlia, per tal d'evitar conseqüències posteriors com són la generació de quists i les disfuncions neurològiques.

Per una banda es suggereix que es podria intentar realitzar teràpia gènica com s'ha descrit per a la malaltia de Krabbe o per a la Adrenoleucodistrofia. Mitjançant vectors virals (adenoassociats o lentivirus) es podria reincorporar de nou la proteïna MLC1 o GlialCAM per intentar revertir el fenotip vacuolitzant. D'altra banda també es podria realitzar algun tipus de teràpia focalitzada en la recuperació de l'activitat de CIC-2 en els oligodendròcits.

CONCLUSIONS

1. La generació i la caracterització del ratolí *knock-out* de *Mlc1* han permès identificar que la proteïna MLC1 és únicament astrocitària. A part, s'ha pogut observar que la manca de MLC1 dóna lloc a diferents alteracions de localització i de la funció en les proteïnes GlialCAM i CIC-2, implicant la disfunció del canal de Cl^- CIC-2 directament en la fisiopatologia de la malaltia.
2. El model de ratolí generat és capaç de reproduir el fenotip observat en els pacients durant les etapes inicials de la malaltia.
3. L'estudi del teixit de la pacient ha permès concloure que la causa bioquímica del fenotip MLC és la presència de la mutació S69L. En aquesta mostra també s'ha observat que GlialCAM es troba deslocalitzada en el cerebel indicant que MLC1 és necessària per a l'estabilització de GlialCAM a la membrana cel·lular.
4. GlialCAM és capaç de millorar el tràfic cap a les unions cel·lulars i l'estabilitat de MLC1 quan aquesta es troba mutada. A més, es necessita per la sortida del reticle i per la correcta localització de MLC1 a les unions cel·lulars. Per tant, GlialCAM actua com a xaperona de MLC1.
5. En condicions d'alt contingut de K^+ , com podria ser la situació en què hi ha una alta activitat neuronal, CIC-2 es troba localitzada a les membranes cel·lulars en astròcits de rata i en oligodendròcits, canviant les seves propietats de canal. En canvi, en astròcits deficients de MLC1 i en condicions d'alt contingut de K^+ , GlialCAM i CIC-2 es queden retingudes intracel·lularment. Aquest fet estaria indicant que aquestes proteïnes podrien tenir una funció en el procés de sifoneig de K^+ i, per tant, la deslocalització de GlialCAM i CIC-2 podria donar lloc a un desordre en l'homeòstasi d'aigua i d'ions.
6. L'obtenció del model de peix zebra *knock-out* i de noves eines pel seu estudi han permès comprovar que la relació funcional entre MLC1 i GlialCAM es conserva entre espècies. Per tant aquest model obre les portes a noves vies d'investigació per a entendre la fisiopatologia MLC.

BIBLIOGRAFIA

- Abascal, F., and Zardoya, R. (2012). LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *Bioessays* 34, 551–560.
- Abrams, C.K., and Scherer, S.S. (2012). Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2030–2047.
- Altevogt, B.M., and Paul, D.L. (2004). Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J. Neurosci.* 24, 4313–4323.
- Alvarez-Maubecin, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J.T., and Van Bockstaele, E.J. (2000). Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* 20, 4091–4098.
- 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.
- Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Haug, F.-M., Froehner, S.C., Adams, M.E., Neely, J.D., Agre, P., Ottersen, O.P., et al. (2003). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2106–2111.
- Arnedo, T., Aiello, C., Jeworutzki, E., Dentici, M.L., Uziel, G., Simonati, A., Pusch, M., Bertini, E., and Estévez, R. (2014). Expanding the spectrum of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two patients with GLIALCAM mutations. *Neurogenetics* 15, 41–48.
- Arun, P., Madhavarao, C.N., Moffett, J.R., Hamilton, K., Grunberg, N.E., Ariyannur, P.S., Gahl, W.A., Anikster, Y., Mog, S., Hallows, W.C., et al. (2010). Metabolic acetate therapy improves phenotype in the tremor rat model of Canavan disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 195–210.
- Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., et al. (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8384–8389.
- Barateiro, A., and Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., and Jendrach, M. (2005). TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J. Cell Sci.* 118, 2435–2440.
- 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. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 141–152.
- Benarroch, E.E. (2005). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc.* 80, 1326–1338.
- 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., Amiry-Moghaddam, M., Caprini, M., Mylonakou, M.N., Rapisarda, C., Ottersen, O.P., and Ferroni, S. (2007a). Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience* 148, 876–892.
- Benfenati, V., Nicchia, G.P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A., and Ferroni, S. (2007b). Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2563–2568.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226, 735–745.
- 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.
- 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.
- 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.
- Boison, D., and Stoffel, W. (1989). Myelin-deficient rat: a point mutation in exon III (A----C, Thr75----Pro) of the myelin proteolipid protein causes dysmyelination and oligodendrocyte death. *EMBO J.* 8, 3295–3302.
- 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 Neuropathol.* 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. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 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. *EMBO J.* 20, 1289–1299.
- Bouvier, J., and Cheng, J.-G. (2009). Recombineering-based procedure for creating Cre/loxP conditional knockouts in the mouse. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 23, Unit 23.13.
- Bovolenta, P., Liem, R.K.H., and Mason, C.A. (1984). Development of cerebellar astroglia: Transitions in form and cytoskeletal content. *Dev. Biol.* 102, 248–259.
- Bradl, M., Bauer, J., Inomata, T., Zielasek, J., Nave, K.A., Toyka, K., Lassmann, H., and Wekerle, H. (1999). Transgenic Lewis rats overexpressing the proteolipid protein gene: myelin degeneration and its effect on T cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 97, 595–606.
- Branicky, R., Miyazaki, H., Strange, K., and Schafer, W.R. (2014). The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability. *J. Neurosci.* 34, 764–775.
- Brenner, M., Johnson, A.B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J.E., and Messing, A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat. Genet.* 27, 117–120.
- 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.

- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Visentin, S., De Nuccio, C., Molinari, P., Camerini, S., Diociaiuti, M., Petri, S., Minnone, G., Crescenzi, M., et al. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 modulates endosomal pH and protein trafficking in astrocytes: Relevance to MLC disease pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* 66, 1–18.
- 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.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13644–13649.
- Butt, A.M., and Kalsi, A. (2006). Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 33–44.
- Calkins, M.J., Vargas, M.R., Johnson, D.A., and Johnson, J.A. (2010). Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects striatal neurons from mitochondrial complex II inhibition. *Toxicol. Sci.* 115, 557–568.
- 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. *Anal. Biochem.* 423, 109–118.
- Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Apaja, P.M., López de Heredia, M., Sirisi, S., Callejo, G., Arnedo, T., Nunes, V., Lukacs, G.L., Gasull, X., et al. (2013). Insights into MLC pathogenesis: GlialCAM is an MLC1 chaperone required for proper activation of volume-regulated anion currents. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4405–4416.
- Cartier, N., Hacey-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823.
- Caston, J., Delhay-Bouchaud, N., and Mariani, J. (1995). Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+/sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav. Brain Res.* 72, 97–102.
- Cavanagh, J.B. (1999). Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29, 265–295.
- Chapouton, P., Jagasia, R., and Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays* 29, 745–757.
- Chen, Y., Balasubramanian, V., Peng, J., Hurlock, E.C., Tallquist, M., Li, J., and Lu, Q.R. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat. Protoc.* 2, 1044–1051.
- Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K.D., and Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 30, 15769–15777.
- 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.
- Clark, K., Sakowski, L., Sperle, K., Banser, L., Landel, C.P., Bessert, D.A., Skoff, R.P., and Hobson, G.M. (2013). Gait abnormalities and progressive myelin degeneration in a new murine model of Pelizaeus-Merzbacher disease with tandem genomic duplication. *J. Neurosci.* 33, 11788–11799.
- Clayton, G.H., Owens, G.C., Wolff, J.S., and Smith, R.L. (1998). Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 109, 281–292.

D'Agostino, D., Bertelli, M., Gallo, S., Cecchin, S., Albiero, E., Garofalo, P.G., Gambardella, A., St Hilaire, J.-M., Kwiecinski, H., Andermann, E., et al. (2004). Mutations and polymorphisms of the CLCN2 gene in idiopathic epilepsy. *Neurology* 63, 1500–1502.

D'Ambrosio, R., Gordon, D.S., and Winn, H.R. (2002). Differential role of KIR channel and Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-pump in the regulation of extracellular K⁽⁺⁾ in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 87, 87–102.

Depienne, C., Bugiani, M., Dupuits, C., Galanaud, D., Touitou, V., Postma, N., van Berkel, C., Polder, E., Tollard, E., Darios, F., et al. (2013). Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol.* 12, 659–668.

Dever, T.E. (2002). Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell* 108, 545–556.

Dibaj, P., Kaiser, M., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F., and Neusch, C. (2007). Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J. Neurochem.* 103, 2620–2628.

Duarri, A., Tejjido, O., López-Hernández, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacín, M., Martínez, A., et al. (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3728–3739.

Duarri, A., Lopez de Heredia, M., Capdevila-Nortes, X., Ridder, M.C., Montolio, M., López-Hernández, T., Boor, I., Lien, C.-F., Hagemann, T., Messing, A., et al. (2011). Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol. Dis.* 43, 228–238.

Duffner, P.K., Caviness, V.S., Erbe, R.W., Patterson, M.C., Schultz, K.R., Wenger, D.A., and Whitley, C. (2009). The long-term outcomes of presymptomatic infants transplanted for Krabbe disease: report of the workshop held on July 11 and 12, 2008, Holiday Valley, New York. *Genet. Med.* 11, 450–454.

Duncan, I.D., Hammang, J.P., Jackson, K.F., Wood, P.M., Bunge, R.P., and Langford, L. (1988). Transplantation of oligodendrocytes and Schwann cells into the spinal cord of the myelin-deficient rat. *J. Neurocytol.* 17, 351–360.

Duncan, I.D., Kondo, Y., and Zhang, S.-C. (2011). The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics* 8, 607–624.

Ernest, N.J., Weaver, A.K., Van Duyn, L.B., and Sontheimer, H.W. (2005). Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1451–60.

Escolar, M.L., Poe, M.D., Provenzale, J.M., Richards, K.C., Allison, J., Wood, S., Wenger, D.A., Pietryga, D., Wall, D., Champagne, M., et al. (2005). Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 2069–2081.

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.

Ferrer, I., Kapfhammer, J.P., Hindelang, C., Kemp, S., Troffer-Charlier, N., Broccoli, V., Callyzot, N., Mooyer, P., Selhorst, J., Vreken, P., et al. (2005). Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3565–3577.

Ferrer, I., Aubourg, P., and Pujol, A. (2010). General aspects and neuropathology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20, 817–830.

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.

- Fischer, G., and Kettenmann, H. (1985). Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. *Exp. Cell Res.* 159, 273–279.
- Forss-Petter, S., Werner, H., Berger, J., Lassmann, H., Molzer, B., Schwab, M.H., Bernheimer, H., Zimmermann, F., and Nave, K.A. (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J. Neurosci. Res.* 50, 829–843.
- Fourcade, S., López-Erauskin, J., Galino, J., Duval, C., Naudi, A., Jove, M., Kemp, S., Villarroya, F., Ferrer, I., Pamplona, R., et al. (2008). Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1762–1773.
- Franklin, R.J.M., and Ffrench-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 839–855.
- Franklin, R.J.M., and Kotter, M.R. (2008). The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. *J. Neurol.* 255 *Suppl*, 19–25.
- Galino, J., Ruiz, M., Fourcade, S., Schlüter, A., López-Erauskin, J., Guilera, C., Jove, M., Naudi, A., García-Arumí, E., Andreu, A.L., et al. (2011). Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2095–2107.
- García-Olivares, J., Alekov, A., Boroumand, M.R., Begemann, B., Hidalgo, P., and Fahlke, C. (2008). Gating of human ClC-2 chloride channels and regulation by carboxy-terminal domains. *J. Physiol.* 586, 5325–5336.
- 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.
- Geva, M., Cabilly, Y., Assaf, Y., Mindroul, N., Marom, L., Raini, G., Pinchasi, D., and Elroy-Stein, O. (2010). A mouse model for eukaryotic translation initiation factor 2B-leucodystrophy reveals abnormal development of brain white matter. *Brain* 133, 2448–2461.
- Giaume, C., and Venance, L. (1995). Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2, 335–345.
- Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002576.
- 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. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B., and Braun, P.E. (1996). Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 453–466.
- Gritti, A. (2011). Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1153–1167.
- Gruenenfelder, F.I., Thomson, G., Penderis, J., and Edgar, J.M. (2011). Axon-glial interaction in the CNS: what we have learned from mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Anat.* 219, 33–43.
- Hagemann, T.L., Gaeta, S.A., Smith, M.A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Messing, A. (2005). Gene expression analysis in mice with elevated glial fibrillary acidic protein and Rosenthal fibers

reveals a stress response followed by glial activation and neuronal dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2443–2458.

Hagemann, T.L., Connor, J.X., and 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.

Hagemann, T.L., Boelens, W.C., Wawrousek, E.F., and Messing, A. (2009). Suppression of GFAP toxicity by alphaB-crystallin in mouse models of Alexander disease. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1190–1199.

Haj-Yasein, N.N., Jensen, V., Østby, I., Omholt, S.W., Voipio, J., Kaila, K., Ottersen, O.P., Hvalby, Ø., and Nagelhus, E.A. (2012). Aquaporin-4 regulates extracellular space volume dynamics during high-frequency synaptic stimulation: a gene deletion study in mouse hippocampus. *Glia* **60**, 867–874.

Hewett, J.A. (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J. Neurochem.* **110**, 1717–1736.

Hoegg-Beiler, M.B., Sirisi, S., Orozco, I.J., Ferrer, I., Hohensee, S., Auberson, M., Gödde, K., Vilches, C., de Heredia, M.L., Nunes, V., et al. (2014). Disrupting MLC1 and GlialCAM and CIC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nat. Commun.* **5**.

Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., and Pedersen, S.F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* **89**, 193–277.

Igisu, H., and Suzuki, K. (1984). Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic leukodystrophy. *Science* **224**, 753–755.

Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte “hemichannels”. *J. Neurosci.* **29**, 7092–7097.

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.

Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R.K., and Goldman, J.E. (1989). Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander’s disease brain. *Cell* **57**, 71–78.

Jayakumar, A.R., and Norenberg, M.D. (2010). The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metab. Brain Dis.* **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. *J. Neurochem.* **117**, 437–448.

Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A., and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch.* **437**, 783–795.

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.

Jentsch, T.J., Neagoe, I., and Scheel, O. (2005). CLC chloride channels and transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 319–325.

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 CIC-2 Cl(-) channel auxiliary subunit. *Neuron* **73**, 951–961.

Jordt, S.E., and Jentsch, T.J. (1997). Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. *EMBO J.* **16**, 1582–1592.

- Kagawa, T., Ikenaka, K., Inoue, Y., Kuriyama, S., Tsujii, T., Nakao, J., Nakajima, K., Aruga, J., Okano, H., and Mikoshiba, K. (1994). Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 13, 427–442.
- Kajander, T., Cortajarena, A.L., and Regan, L. (2006). Consensus design as a tool for engineering repeat proteins. *Methods Mol. Biol.* 340, 151–170.
- Kalsi, A.S., Greenwood, K., Wilkin, G., and Butt, A.M. (2004). Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J. Anat.* 204, 475–485.
- Karim, S.A., Barrie, J.A., McCulloch, M.C., Montague, P., Edgar, J.M., Iden, D.L., Anderson, T.J., Nave, K.-A., Griffiths, I.R., and McLaughlin, M. (2010). PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 58, 1727–1738.
- Kimelberg, H.K. (2004). Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 129, 851–860.
- 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. *J. Neurosci.* 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.
- Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T. (2000). Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem.* 74, 2512–2519.
- Klugmann, M., Schwab, M.H., Pühlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I.R., and Nave, K.-A. (1997). Assembly of CNS Myelin in the Absence of Proteolipid Protein. *Neuron* 18, 59–70.
- Van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G., and Tortori Donati, P. (1995a). Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology* 37, 679–686.
- Van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., and Valk, J. (1995b). 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.
- Van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., and Scheper, G.C. (2006). Vanishing white matter disease. *Lancet Neurol.* 5, 413–423.
- 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. *Ann. Neurol.* 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 Neurol.* 11, 973–985.
- Kobayashi, T., Yamanaka, T., Jacobs, J.M., Teixeira, F., and Suzuki, K. (1980). The Twitcher mouse: an enzymatically authentic model of human globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Brain Res.* 202, 479–483.

- Kobayashi, T., Shinnoh, N., Kondo, A., and Yamada, T. (1997). Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 631–636.
- Kobe, B. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725–732.
- Koeppen, A.H., and Robitaille, Y. (2002). Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 747–759.
- Kofuji, P., and Newman, E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1045–1056.
- Koussa, S., Roukoz, H., Rizk, T., and Mégarbané, A. (2005). [Megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts: a study of a Lebanese family and a review of the literature]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 161, 183–191.
- Kyritsis, N., Kizil, C., Zoicher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsche, A., and Brand, M. (2012). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338, 1353–1356.
- Lalonde, R., Bensoula, A.N., and Filali, M. (1995). Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. *Neurosci. Res.* 22, 423–426.
- Lampe, P.D., and Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 205–215.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M., et al. (2010a). MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.* 37, 581–595.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M., et al. (2010b). MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.* 37, 581–595.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Molinari, P., 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.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913–949.
- Lang, F. (2007). Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J. Am. Coll. Nutr.* 26, 613S–623S.
- LaPash Daniels, C.M., Austin, E. V, Rockney, D.E., Jacka, E.M., Hagemann, T.L., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Messing, A. (2012). Beneficial effects of Nrf2 overexpression in a mouse model of Alexander disease. *J. Neurosci.* 32, 10507–10515.
- Larsen, B.R., Assentoft, M., Cotrina, M.L., Hua, S.Z., Nedergaard, M., Kaila, K., Voipio, J., and MacAulay, N. (2014). Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. *Glia* 62, 608–622.
- Lattanzi, A., Neri, M., Maderna, C., di Girolamo, I., Martino, S., Orlacchio, A., Amendola, M., Naldini, L., and Gritti, A. (2010). Widespread enzymatic correction of CNS tissues by a single intracerebral injection of therapeutic lentiviral vector in leukodystrophy mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2208–2227.

- 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.
- 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. (2001a). 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., Vermeulen, G., Könst, A.A., Naidu, S., Mulders, J., Visser, A., Kersbergen, P., Mobach, D., Fonds, D., van Berkel, C.G., et al. (2001b). Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat. Genet.* *29*, 383–388.
- 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. *Hum. Genet.* *110*, 279–283.
- Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* *17*, 607–615.
- Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 353–367.
- Liu, X., Bandyopadhyay, B.C., Bandyopadhyay, B., Nakamoto, T., Singh, B., Liedtke, W., Melvin, J.E., and Ambudkar, I. (2006). A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *J. Biol. Chem.* *281*, 15485–15495.
- López-Erauskin, J., Galino, J., Bianchi, P., Fourcade, S., Andreu, A.L., Ferrer, I., Muñoz-Pinedo, C., and Pujol, A. (2012). Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain* *135*, 3584–3598.
- 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.
- Lu, J.F., Lawler, A.M., Watkins, P.A., Powers, J.M., Moser, A.B., Moser, H.W., and Smith, K.D. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9366–9371.
- Luzi, P., Rafi, M.A., Zaka, M., Curtis, M., Vanier, M.T., and Wenger, D.A. (2001). Generation of a mouse with low galactocerebrosidase activity by gene targeting: a new model of globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Mol. Genet. Metab.* *73*, 211–223.
- MacVicar, B.A., Feighan, D., Brown, A., and Ransom, B. (2002). Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: role for K(+) uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes. *Glia* *37*, 114–123.
- Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram, K., Trotter, J., Willecke, K., and Kettenmann, H. (2010). Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* *58*, 1104–1117.

Mahmood, A., Raymond, G. V., Dubey, P., Peters, C., and Moser, H.W. (2007). Survival analysis of haematopoietic cell transplantation for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: a comparison study. *Lancet Neurol.* 6, 687–692.

Mahmoud, I.G., Mahmoud, M., Refaat, M., Girgis, M., Waked, N., El Badawy, A., Selim, L., Hassan, S., and Abdel Aleem, A.K. (2014). Clinical, neuroimaging, and genetic characteristics of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in Egyptian patients. *Pediatr. Neurol.* 50, 140–148.

Makara, J. (2003). Astrocytes from mouse brain slices express CIC-2-mediated Cl⁻ currents regulated during development and after injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 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.

Marmor, M.F., Fulton, A.B., Holder, G.E., Miyake, Y., Brigell, M., and Bach, M. (2009). ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc. Ophthalmol.* 118, 69–77.

Marom, L., Ulitsky, I., Cabilly, Y., Shamir, R., and Elroy-Stein, O. (2011). A point mutation in translation initiation factor eIF2B leads to function- and time-specific changes in brain gene expression. *PLoS One* 6, e26992.

Masland, R.H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 431–436.

Matalon, R., and Michals-Matalon, K. (1999). Biochemistry and molecular biology of Canavan disease. *Neurochem. Res.* 24, 507–513.

Matalon, R.M., and Michals-Matalon, K. (2000). Spongy degeneration of the brain, Canavan disease: biochemical and molecular findings. *Front. Biosci.* 5, D307–11.

Matalon, R., Surendran, S., Rady, P.L., Quast, M.J., Campbell, G.A., Matalon, K.M., Tyring, S.K., Wei, J., Peden, C.S., Ezell, E.L., et al. (2003). Adeno-associated virus-mediated aspartoacylase gene transfer to the brain of knockout mouse for canavan disease. *Mol. Ther.* 7, 580–587.

Mayer, J.A., Larsen, E.C., Kondo, Y., and Duncan, I.D. (2011). Characterization of a PLP-overexpressing transgenic rat, a model for the congenital form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurobiol. Dis.* 44, 231–238.

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.

Menichella, D.M., Goodenough, D.A., Sirkowski, E., Scherer, S.S., and Paul, D.L. (2003). Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 23, 5963–5973.

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.

Mersmann, N., Tkachev, D., Jelinek, R., Röth, P.T., Möbius, W., Ruhwedel, T., Rühle, S., Weber-Fahr, W., Sartorius, A., and Klugmann, M. (2011). Aspartoacylase-lacZ knockin mice: an engineered model of Canavan disease. *PLoS One* 6, e20336.

Messing, A., Head, M.W., Galles, K., Galbreath, E.J., Goldman, J.E., and Brenner, M. (1998). Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 152, 391–398.

Messing, A., Brenner, M., Feany, M.B., Nedergaard, M., and Goldman, J.E. (2012). Alexander disease. *J. Neurosci.* 32, 5017–5023.

Moffett, J.R., Arun, P., Ariyannur, P.S., Garbern, J.Y., Jacobowitz, D.M., and Namboodiri, A.M.A. (2011). Extensive aspartoacylase expression in the rat central nervous system. *Glia* 59, 1414–1434.

- Moghaddam, B., and Adams, R.N. (1987). Regional differences in resting extracellular potassium levels of rat brain. *Brain Res.* 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. *J. Biol. Chem.* 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. *J. Cell. Physiol.* 219, 382–391.
- Morató, L., Galino, J., Ruiz, M., Calingasan, N.Y., Starkov, A.A., Dumont, M., Naudí, A., Martínez, J.J., Aubourg, P., Portero-Otín, M., et al. (2013). Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain* 136, 2432–2443.
- Moser, T., Chow, R.H., and Neher, E. (1995). Swelling-induced catecholamine secretion recorded from single chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 431, 196–203.
- Nadon, N.L., Duncan, I.D., and Hudson, L.D. (1990). A point mutation in the proteolipid protein gene of the “shaking pup” interrupts oligodendrocyte development. *Development* 110, 529–537.
- Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., and Ottersen, O.P. (2004a). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905–913.
- Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., and Ottersen, O.P. (2004b). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905–913.
- Nagy, J.I., and Rash, J.E. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun. Adhes.* 10, 401–406.
- Nagy, J.I., Dudek, F.E., and Rash, J.E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47, 191–215.
- Nave, K.A., Lai, C., Bloom, F.E., and Milner, R.J. (1986). Jimpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9264–9268.
- Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263, 1768–1771.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530.
- Neri, M., Ricca, A., di Girolamo, I., Alcalá-Franco, B., Cavazzin, C., Orlacchio, A., Martino, S., Naldini, L., and Gritti, A. (2011). Neural stem cell gene therapy ameliorates pathology and function in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Stem Cells* 29, 1559–1571.
- 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.
- Newman, E.A., Frambach, D.A., and Odette, L.L. (1984). Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225, 1174–1175.
- Ng, A.C.Y., Eisenberg, J.M., Heath, R.J.W., Huett, A., Robinson, C.M., Nau, G.J., and Xavier, R.J. (2011). Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl, 4631–4638.

- Nicchia, G.P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C.F., Frigeri, A., and Spray, D.C. (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* 19, 1674–1676.
- Nilius, B., and Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol. Scand.* 177, 119–147.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., Buyse, G., Manolopoulos, V., and Droogmans, G. (1997). Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68, 69–119.
- Nishi, K., Tanegashima, A., Yamamoto, Y., Ushiyama, I., Ikemoto, K., Yamasaki, S., Nishimura, A., Rand, S., and Brinkmann, B. (2003). Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Leg. Med. (Tokyo)*. 5, 117–131.
- Norenberg, M.D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 756–762.
- Nualart-Marti, A., Solsona, C., and Fields, R.D. (2013). Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 69–78.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29, 547–553.
- Odermatt, B., Wellershaus, K., Wallraff, A., Seifert, G., Degen, J., Euwens, C., Fuss, B., Büssow, H., Schilling, K., Steinhäuser, C., et al. (2003). Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J. Neurosci.* 23, 4549–4559.
- Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113, 221–233.
- Okada, Y. (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* 273, C755–89.
- Okada, Y., Shimizu, T., Maeno, E., Tanabe, S., Wang, X., and Takahashi, N. (2006). Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J. Membr. Biol.* 209, 21–29.
- Okada, Y., Sato, K., and Numata, T. (2009). Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J. Physiol.* 587, 2141–2149.
- Olsen, M.L., Higashimori, H., Campbell, S.L., Hablitz, J.J., and Sontheimer, H. (2006). Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53, 516–528.
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G., and Kuffler, S.W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 29, 788–806.
- Orthmann-Murphy, J.L., Enriquez, A.D., Abrams, C.K., and Scherer, S.S. (2007). Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 629–641.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cell. Microbiol.* 11, 191–198.
- 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.
- Pasantes-Morales, H., and Martín del Río, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 351, 317–328.

Pasantes-Morales, H., Lezama, R.A., Ramos-Mandujano, G., and Tuz, K.L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am. J. Med.* 119, S4–11.

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. *Neurologia* 20, 33–40.

Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbané, A., et al. (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534–537.

Pinto, L.H., and Enroth-Cugell, C. (2000). Tests of the mouse visual system. *Mamm. Genome* 11, 531–536.

Plotkin, M.D., Snyder, E.Y., Hebert, S.C., and Delpire, E. (1997). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J. Neurobiol.* 33, 781–795.

Prukop, T., Epplen, D.B., Nientiedt, T., Wichert, S.P., Fledrich, R., Stassart, R.M., Rossner, M.J., Edgar, J.M., Werner, H.B., Nave, K.-A., et al. (2014). Progesterone antagonist therapy in a Pelizaeus-Merzbacher mouse model. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 533–546.

Pujol, A. (2002). Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 499–505.

Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pàmols, T., Giròs, M., and Mandel, J.L. (2004). Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2997–3006.

Qiu, Z., Dubin, A.E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L.J., Reinhardt, J., Orth, A.P., and Patapoutian, A. (2014). SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel. *Cell* 157, 447–458.

Rafi, M.A., Zhi Rao, H., Passini, M.A., Curtis, M., Vanier, M.T., Zaka, M., Luzi, P., Wolfe, J.H., and Wenger, D.A. (2005). AAV-mediated expression of galactocerebrosidase in brain results in attenuated symptoms and extended life span in murine models of globoid cell leukodystrophy. *Mol. Ther.* 11, 734–744.

Ransom, C.B., Ransom, B.R., and Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. *J. Physiol.* 522 Pt 3, 427–442.

Rash, J.E. (2010). Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168, 982–1008.

Rash, J.E., Duffy, H.S., Dudek, F.E., Bilhartz, B.L., Whalen, L.R., and Yasumura, T. (1997). Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a “panglial syncytium” that is not coupled to neurons. *J. Comp. Neurol.* 388, 265–292.

Rash, J.E., Yasumura, T., Dudek, F.E., and Nagy, J.I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J. Neurosci.* 21, 1983–2000.

Readhead, C., Schneider, A., Griffiths, I., and Nave, K.A. (1994). Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 12, 583–595.

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. *J. Neurosci. Res.* 83, 1231–1240.

Ridder, W.H., and Nusinowitz, S. (2006). The visual evoked potential in the mouse--origins and response characteristics. *Vision Res.* 46, 902–913.

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 leukoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain* 134, 3342–3354.

Van Roermund, C.W.T., Visser, W.F., Ijlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H.R., and Wanders, R.J.A. (2008). The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J.* 22, 4201–4208.

Saher, G., Rudolphi, F., Corthals, K., Ruhwedel, T., Schmidt, K.-F., Löwel, S., Dibaj, P., Barrette, B., Möbius, W., and Nave, K.-A. (2012). Therapy of Pelizaeus-Merzbacher disease in mice by feeding a cholesterol-enriched diet. *Nat. Med.* 18, 1130–1135.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

Saint-Martin, C., Gauvain, G., Teodorescu, G., Gourfinkel-An, I., Fedirko, E., Weber, Y.G., Maljevic, S., Ernst, J.-P., Garcia-Olivares, J., Fahlke, C., et al. (2009). Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Hum. Mutat.* 30, 397–405.

Sakai, N., Inui, K., Tatsumi, N., Fukushima, H., Nishigaki, T., Taniike, M., Nishimoto, J., Tsukamoto, H., Yanagihara, I., Ozono, K., et al. (1996). Molecular cloning and expression of cDNA for murine galactocerebrosidase and mutation analysis of the twitcher mouse, a model of Krabbe's disease. *J. Neurochem.* 66, 1118–1124.

Sargiannidou, I., Markoullis, K., and Kleopa, K.A. (2010). Molecular mechanisms of gap junction mutations in myelinating cells. *Histol. Histopathol.* 25, 1191–1206.

Sawada, A., Takihara, Y., Kim, J.Y., Matsuda-Hashii, Y., Tokimasa, S., Fujisaki, H., Kubota, K., Endo, H., Onodera, T., Ohta, H., et al. (2003). A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J. Clin. Invest.* 112, 1707–1713.

Scemes, E., Spray, D.C., and Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflugers Arch.* 457, 1207–1226.

Scheper, G.C., van Berkel, C.G.M., Leisle, L., de Groot, K.E., Errami, A., Jentsch, T.J., and Van der Knaap, M.S. (2010). Analysis of CLCN2 as candidate gene for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 14, 255–257.

Schiffmann, R., and Elroy-Stein, O. (2006). Childhood ataxia with CNS hypomyelination/vanishing white matter disease--a common leukodystrophy caused by abnormal control of protein synthesis. *Mol. Genet. Metab.* 88, 7–15.

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.

Schneider, A., Montague, P., Griffiths, I., Fanarraga, M., Kennedy, P., Brophy, P., and Nave, K.A. (1992). Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 358, 758–761.

Schwarcz, R., and Coyle, J.T. (1977). Striatal lesions with kainic acid: neurochemical characteristics. *Brain Res.* 127, 235–249.

Schwarcz, R., and Köhler, C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 38, 85–90.

- Scruggs, B.A., Zhang, X., Bowles, A.C., Gold, P.A., Semon, J.A., Fisher-Perkins, J.M., Zhang, S., Bonvillain, R.W., Myers, L., Li, S.C., et al. (2013). Multipotent stromal cells alleviate inflammation, neuropathology, and symptoms associated with globoid cell leukodystrophy in the twitcher mouse. *Stem Cells* 31, 1523–1534.
- Sen, E., and Levison, S.W. (2006). Astrocytes and developmental white matter disorders. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 97–104.
- Sener, R.N. (2003). Proton MR spectroscopy demonstration of taurine peaks in megalencephalic leukoencephalopathy with cysts. *Comput. Med. Imaging Graph.* 27, 23–26.
- Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., and Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods* 189, 180–185.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the Gliovascular Interface. *J. Neurosci.* 23, 9254–9262.
- Singhal, B.S., Gursahani, R.D., Udani, V.P., and Biniwale, A.A. (1996). Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr. Neurol.* 14, 291–296.
- Sirisi, S., Folgueira, M., López-Hernández, T., Minieri, L., Pérez-Rius, C., Gaitán-Peñas, H., Zang, J., Martínez, A., Capdevila-Nortes, X., de la Villa, P., et al. (2014). Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Hum. Mol. Genet.*
- Smith, R.L., Clayton, G.H., Wilcox, C.L., Escudero, K.W., and Staley, K.J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 15, 4057–4067.
- Sobrin, L., Lam, B.L., Liu, M., Feuer, W.J., and Davis, J.L. (2005). Electroretinographic monitoring in birdshot chorioretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 140, 52–64.
- 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.
- Sosunov, A.A., Guilfoyle, E., Wu, X., McKhann, G.M., and Goldman, J.E. (2013). Phenotypic conversions of “protoplasmic” to “reactive” astrocytes in Alexander disease. *J. Neurosci.* 33, 7439–7450.
- Spörkel, O., Uschkureit, T., Büssow, H., and Stoffel, W. (2002). Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development. *Glia* 37, 19–30.
- Su, G., Kintner, D.B., and Sun, D. (2002a). Contribution of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter to high-[K⁽⁺⁾]_o-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1136–46.
- Su, G., Kintner, D.B., Flagella, M., Shull, G.E., and Sun, D. (2002b). Astrocytes from Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1147–60.
- Surendran, S., Matalon, K.M., Szucs, S., Tying, S.K., and Matalon, R. (2003). Metabolic changes in the knockout mouse for Canavan’s disease: implications for patients with Canavan’s disease. *J. Child Neurol.* 18, 611–615.
- Surendran, S., Campbell, G.A., Tying, S.K., and Matalon, R. (2005). Aspartoacylase gene knockout results in severe vacuolation in the white matter and gray matter of the spinal cord in the mouse. *Neurobiol. Dis.* 18, 385–389.

- Suzuki, K. (2003). Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *J. Child Neurol.* 18, 595–603.
- Taniike, M., and Suzuki, K. (1994). Spacio-temporal progression of demyelination in twitcher mouse: with clinico-pathological correlation. *Acta Neuropathol.* 88, 228–236.
- Tejjido, 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.
- Tejjido, 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.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* 88, 983–1008.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57–60.
- Tian, R., Wu, X., Hagemann, T.L., Sosunov, A.A., Messing, A., McKhann, G.M., and Goldman, J.E. (2010). Alexander disease mutant glial fibrillary acidic protein compromises glutamate transport in astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 335–345.
- Tinsa, F., Farid, O., Douira, W., Rodriguez, D., Burglen, L., Boussetta, K., and Bousnina, S. (2009). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in a Tunisian boy. *J. Child Neurol.* 24, 87–89.
- Topcu, M., Saatci, I., Topcuoglu, M.A., Kose, G., and Kunak, B. (1998). Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Dev.* 20, 142–153.
- Torkildsen, O., Brunborg, L.A., Myhr, K.-M., and Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 188, 72–76.
- Traka, M., Wollmann, R.L., Cerda, S.R., Dugas, J., Barres, B.A., and Popko, B. (2008). Nur7 is a nonsense mutation in the mouse aspartoacylase gene that causes spongy degeneration of the CNS. *J. Neurosci.* 28, 11537–11549.
- Uhlenberg, B., Schuelke, M., Rüschemdorf, F., Ruf, N., Kaindl, A.M., Henneke, M., Thiele, H., Stoltenburg-Didinger, G., Aksu, F., Topaloğlu, H., et al. (2004). Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 251–260.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110.
- Vargas, M.R., Johnson, D.A., Sirkis, D.W., Messing, A., and Johnson, J.A. (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 28, 13574–13581.
- Verkman, A.S., and Galiotta, L.J. V (2009). Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 153–171.
- Voss, F.K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., von Kries, J.P., Stauber, T., and Jentsch, T.J. (2014). Identification of LRRC8 Heteromers as an Essential Component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC. *Science* 344, 634–638.
- Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., and Steinhäuser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 5438–5447.

- Wang, D.D., and Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86, 342–367.
- Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T., and Nedergaard, M. (2012). Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 7911–7916.
- Wang, L., Colodner, K.J., and Feany, M.B. (2011). Protein misfolding and oxidative stress promote glial-mediated neurodegeneration in an Alexander disease model. *J. Neurosci.* 31, 2868–2877.
- Warth, A., Mittelbronn, M., and Wolburg, H. (2005). Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 109, 418–426.
- Wasseff, S.K., and Scherer, S.S. (2011). Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol. Dis.* 42, 506–513.
- Wenger, D.A., Rafi, M.A., Luzi, P., Datto, J., and Costantino-Ceccarini, E. (2000). Krabbe disease: genetic aspects and progress toward therapy. *Mol. Genet. Metab.* 70, 1–9.
- Willott, J.F. (2006). Measurement of the auditory brainstem response (ABR) to study auditory sensitivity in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8, Unit8.21B.
- De Wit, J., Hong, W., Luo, L., and Ghosh, A. (2011). Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 697–729.
- 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* 12, 388–396.
- Yamada, J., Serikawa, T., Ishiko, J., Inui, T., Takada, H., Kawai, Y., and Okaniwa, A. (1985). Rats with congenital tremor and curled whiskers and hair. *Jikken Dobutsu.* 34, 183–188.
- 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.
- 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. *Turk. J. Pediatr.* 52, 179–183.
- Young, A.B. (2009). Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come! *J. Neurosci.* 29, 12722–12728.
- Yu, L.-H., Morimura, T., Numata, Y., Yamamoto, R., Inoue, N., Antalfy, B., Goto, Y., Deguchi, K., Osaka, H., and Inoue, K. (2012). Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol. Genet. Metab.* 106, 108–114.
- Yum, S.W., Kleopa, K.A., Shumas, S., and Scherer, S.S. (2002). Diverse trafficking abnormalities of connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol. Dis.* 11, 43–52.
- Zhang, H., and Verkman, A.S. (2008). Aquaporin-4 independent Kir4.1 K⁺ channel function in brain glial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 1–10.
- Zhou, X., Jen, P.H.-S., Seburn, K.L., Frankel, W.N., and Zheng, Q.Y. (2006). Auditory brainstem responses in 10 inbred strains of mice. *Brain Res.* 1091, 16–26.
- Zizioli, D., Guarienti, M., Tobia, C., Gariano, G., Borsani, G., Bresciani, R., Ronca, R., Giacomuzzi, E., Preti, A., Gaudenzi, G., et al. (2014). Molecular cloning and knockdown of galactocerebrosidase in

zebrafish: new insights into the pathogenesis of Krabbe's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 665–675.

Zúñiga, L., Niemeyer, M.I., Varela, D., Catalán, M., Cid, L.P., and Sepúlveda, F. V (2004). The voltage-dependent CIC-2 chloride channel has a dual gating mechanism. *J. Physiol.* 555, 671–682.

**ANNEX: ARTÍCLES PUBLICATS DURANT LA
REALITZACIÓ D'AQUESTA TESI**

