



Paper del canal de clorur CIC-2 en les patologies de la mielina

Tanit Arnedo Llena

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.

Paper del canal de clorur ClC-2 en les patologies de la mielina.

Tesi doctoral: Tanit Arnedo Llana
Departament de Ciències Fisiològiques II,
Unitat de Fisiologia
Universitat de Barcelona 2015

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

RESULTATS

*“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen
lugar a dudas”*

Louis Pasteur

CAPÍTOL 1.

Relació estructura-funció de GlialCAM

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals és un tipus rar de leucodistrofia vacuolitzant que afecta principalment la integritat de la mielina. Els pacients que pateixen MLC mostren un quadre clínic caracteritzat per macrocefàlia acusada durant els primers anys de vida, seguida d'un deteriorament lent de les funcions motores i retard mental de grau mig (van der Knaap et al., 2012).

S'ha identificat *MLC1* [MIM #604004] com el gen principal de la malaltia, el qual es troba mutat en el 75% dels pacients (Ilja Boor et al., 2006). Gràcies a l'anàlisi genètic realitzat en el grup de pacients que no presentaven mutacions en *MLC1* es van identificar mutacions en *GLIALCAM* [MIM #611642], essent el segon gen implicat en la malaltia (López-Hernández et al., 2011b).

Actualment, encara es desconeix la funció que desenvolupen *MLC1* i *GlialCAM* en les cèl·lules glijals. És per això, que en aquest capítol s'intentarà avançar en el coneixement bioquímic i estructural de *GLIALCAM*, analitzant la relació entre la seva estructura i la seva funció partint de l'estudi de les mutacions en *GLIALCAM* trobades en pacients afectats per la MLC.

1. ESTUDI BIOQUÍMIC I FUNCIONAL DE LES MUTACIONS EN *GLIALCAM* ASSOCIADES A MLC.

Una caracterització detallada dels pacients afectats per la MLC sense mutacions en *MLC1* va mostrar dos fenotips diferenciats; el fenotip MLC2A, indistingible del fenotip causat per mutacions en *MLC1* i el fenotip MLC2B, el qual mostra una millora progressiva de les característiques clíniques de la malaltia (van der Knaap et al., 2012).

Es va realitzar un estudi genètic en 40 pacients de 34 famílies diferents afectats per la MLC que no presentaven mutacions en *MLC1* on es va observar que 28 d'aquests pacients presentaven mutacions en el gen *GLIALCAM*. Gràcies a aquest anàlisi es va poder identificar 16 mutacions diferents amb un patró d'herència autosòmica tant dominant com recessiva.

Com es pot observar a la **Figura 25**, aquestes mutacions es distribueixen al llarg de la regió extracel·lular de la proteïna i no en la regió transmembrana o citosòlica, a excepció de la mutació recessiva W263X que es troba localitzada al final del domini transmembrana i provoca la truncació de la proteïna, i la mutació L23H que afecta al pèptid senyal (López-Hernández et al., 2011b). 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.

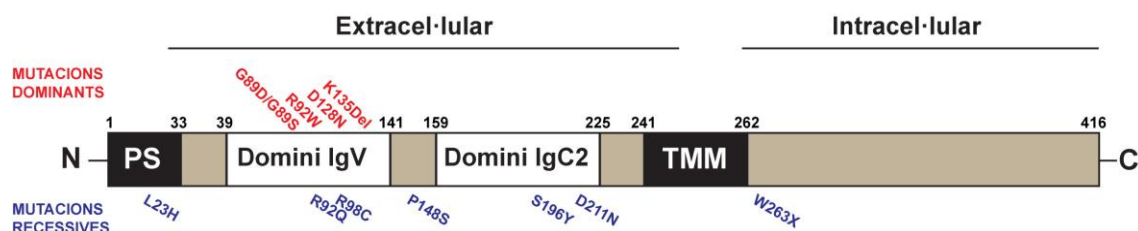


Figura 25. Representació esquemàtica dels dominis de GlialCAM i la posició de les mutacions puntuals trobades en pacients de MLC sense mutacions en *MLC1*. Les mutacions dominants es mostren en vermell, localitzades en el domini IgV. Les mutacions recessives es mostren en blau, distribuïdes per tot el domini extracel·lular. Abreviacions: PS, pèptid senyal; TMM, domini transmembrana; Ig, immunoglobulina. Imatge extreta de (López-Hernández et al., 2011b).

D'aquestes 12 mutacions representades a la **Figura 25**, 10 havien sigut prèviament analitzades per la Dra. Tania López. Així doncs, en el transcurs d'aquesta Tesi es van estudiar bioquímica i funcionalment la mutació dominant Lys135del (K135Del) i la mutació recessiva Asp211Asn (D211N) així com també es van estudiar dues noves mutacions en *GLIALCAM* identificades en dos pacients afectats per la MLC. El primer pacient mostrava el fenotip MLC2B, amb una millora en la MRI i en els paràmetres clínics. En aquest cas, es va identificar una mutació dominant en *GLIALCAM*, la Q56P. El segon pacient, mostrava el fenotip MLC2A, en el qual no s'observava cap millora en els paràmetres clínics tot i que sorprenentment, la MRI d'aquest pacient mostrava una millora parcial. Es va observar que aquest pacient albergava dues mutacions recessives en *GLIALCAM*; la primera, Q56X, que introdueix un codó stop, i la segona, R73W.

Gràcies a l'obtenció per homologia de models moleculars del domini extracel·lular de GlialCAM es pot observar com ambdues noves mutacions *missense* identificades en aquests pacients es troben localitzades en el primer domini variable immunoglobulina (IgV) de GlialCAM (**Figura 26**) al igual que la mutació dominant K135Del. En canvi, la mutació recessiva D211N es troba localitzada en el segon domini immunoglobulina (IgC2).

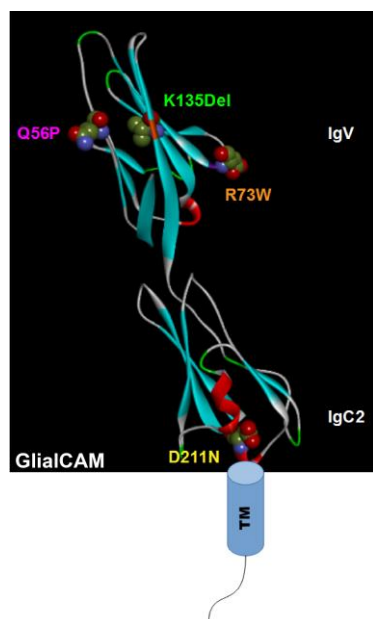


Figura 26. Representació esquemàtica de les posicions dels residus mutats en GlialCAM. Representació de la molècula de GlialCAM i els quatre residus mutats d'estudi. El model estructural del domini extracel·lular es va obtenir per mitjà del servidor EXPASY, el qual realitza el modelatge per homologia. TM: domini transmembrana.

Per a facilitar la comprensió dels resultats obtinguts en l'estudi bioquímic i funcional de GlialCAM, es mostraran els resultats de les mutacions prèviament estudiades per la Dra. Tania López juntament amb les mutacions estudiades durant la realització d'aquesta Tesi.

1.1. EFECTE DE LES MUTACIONS EN ELS NIVELLS PROTEICS DE GlialCAM.

Es va realitzar el clonatge de GlialCAM contenint les diferents mutacions en un vector d'expressió en cèl·lules de mamífer, el pcDNA3. Un cop clonades, primer de tot es va voler estudiar els seus nivells proteics per mitjà de la tècnica WB.

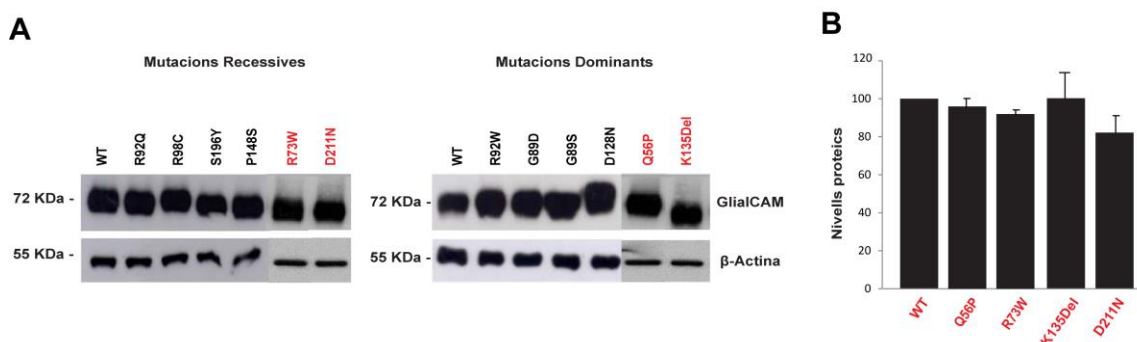


Figura 27. Nivells proteics dels mutants de GLIALCAM en cèl·lules HeLa. (A) Es van transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions corresponents i 48 hores després es van realitzar extractes proteics que es van analitzar posteriorment per mitjà de WB. S'utilitza β -Actina com a control de càrrega. En vermell es mostren les mutacions estudiades durant el desenvolupament d'aquesta Tesi. **(B)** Quantificació dels nivells proteics detectats per WB de les mutacions estudiades en aquesta Tesi. S'utilitza el test estadístic *t Student* no aparellat. Dades corresponents de 3 a 4 experiments independents.

Es va observar com els mutants en *GLIALCAM*, tant els mutants recessius com els dominants, mostraven uns nivells de proteïna similars a la proteïna *wild-type* (**Figura**

27) excepte les mutacions L23H que provocava la supressió total de l'expressió proteica de GlialCAM i la mutació W263X que disminuïa significativament els nivells proteics de la proteïna (dades no mostrades) (Arnedo et al., 2014b).

S'ha descrit que GlialCAM actua com a xaperona de MLC1, interaccionant directament i dirigint el seu tràfic a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011a). A part, també s'ha identificat GlialCAM com a subunitat auxiliar de CIC-2, dirigint la proteïna cap a les unions cel·lulars, augmentant les corrents regulades per CIC-2 i modificant les propietats funcionals del canal (Jeworutzki et al., 2012).

A continuació, es va voler estudiar si els mutants de *GLIALCAM* afectaven als nivells proteics tant de MLC1 com de CIC-2 per mitjà de la tècnica de WB. Es va observar que cap dels mutants de *GLIALCAM* modificava la quantitat d'ambdues proteïnes present en la cèl·lula (**Figura 28**).

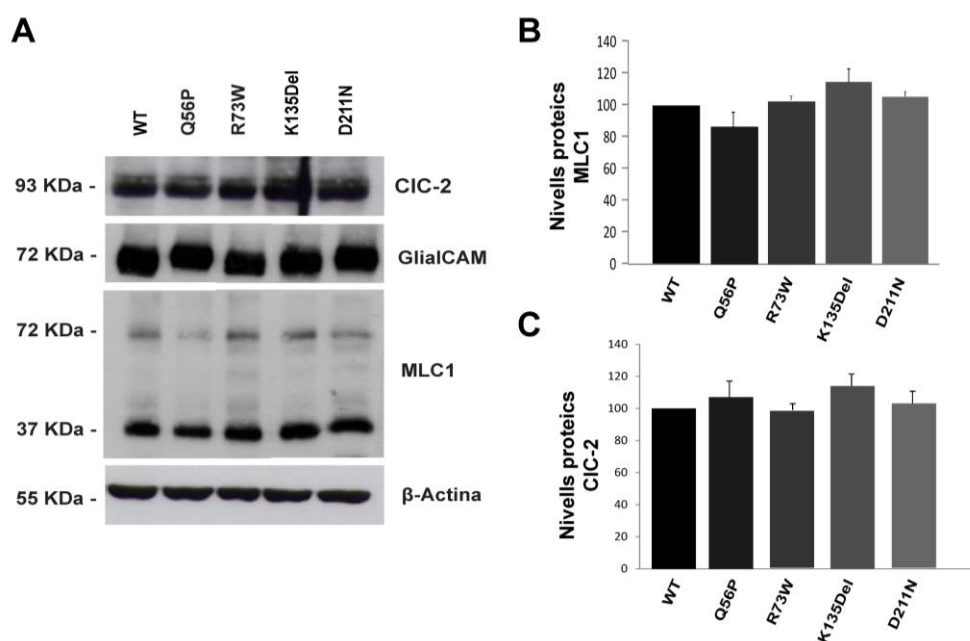


Figura 28. Nivells proteics de MLC1 i CIC-2 en coexpressió amb els mutants de *GLIALCAM* en cèl·lules HeLa. Cèl·lules HeLa van ser cotransfectades amb els mutants de *GLIALCAM* corresponents i hMLC1 o CIC-2-HA. **(A)** 48 hores després es van obtenir extractes proteics que es van analitzar posteriorment per WB. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. **(B)** Quantificació dels nivells proteics de MLC1 detectats per WB. **(C)** Quantificació dels nivells proteics de CIC-2 detectats per WB. S'utilitza el test estadístic *t Student* no aparellat. Dades corresponents de 3 a 6 experiments independents.

Gràcies a l'anàlisi dels nivells d'expressió proteica dels mutants de *GLIALCAM* podem classificar les mutacions en funció de la seva expressió proteica. La majoria de mutacions en *GLIALCAM* no presentaven cap defecte d'expressió proteica per GlialCAM ni tampoc per MLC1 o CIC-2, excepte les mutacions recessives L23H i

W263X les quals provocaven una dràstica reducció en els nivells proteics de GlialCAM (Taula 6).

NIVELLS PROTEICS GlialCAM	MUTACIÓ
MENOR EXPRESSIÓ PROTEICA	L23H, W263X (Recessives)
NIVELLS SIMILARS A LA PROTEÏNA WILD-TYPE	R73W, R92Q, R98C, P148S, S196Y, D211N (Recessives) Q56P, G89D, G89S, R92W, D128N, K135Del (Dominants)

Taula 6. Classificació dels mutants de *GLIALCAM* en funció dels nivells d'expressió proteics.

1.2. EFECTE DE LES MUTACIONS EN *GLIALCAM* EN LA CAPACITAT D'HOMO- I HETEROINTERACCIONAR AMB MLC1 I CIC-2.

S'ha descrit que GlialCAM té la capacitat de formar homodímers (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005). Així doncs es va voler estudiar si la capacitat d'homooligomeritzar dels mutants es trobava afectada. Aquests estudis es van realitzar mitjançant assaigs d'*split*-TEV, tècnica que permet quantificar els nivells d'interacció entre proteïnes desenvolupada pel Dr. Xavier Capdevila, antic membre del grup (Capdevila-Nortes et al., 2012). Dels quatre mutants de GlialCAM estudiats durant el desenvolupament d'aquesta Tesi només es va poder realitzar aquest assaig per al mutant K135Del ja que el constructe portador de la mutació recessiva D211N va resultar inestable i per als mutants Q56P i R73W es va decidir no realitzar l'assaig.

Es va observar que la majoria de les proteïnes portadores de mutacions presentaven defecte en els nivells d'interacció entre molècules de GlialCAM respecte la proteïna *wild-type*. No es va detectar cap defecte en les mutacions recessives P148S i S196Y així com tampoc en les mutacions dominants D128N i K135Del (**Figura 29**).

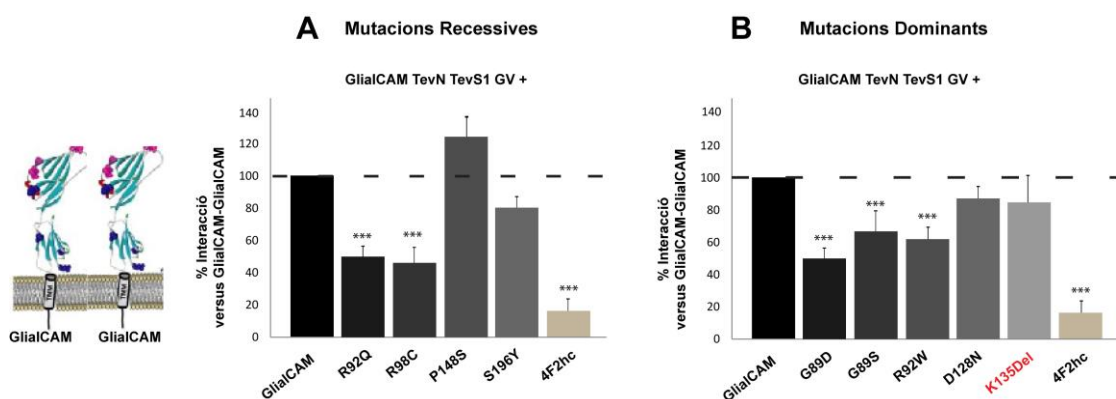


Figura 29. Mutacions en *GLIALCAM* causants de MLC afecten a la homooligomerització de *GlialCAM*. Es van cotransfectar cèl·lules HeLa amb les construccions corresponents i la interacció es va monitoritzar per mitjà de l'assaig de *split*-TEV. La senyal obtinguda per a l'homooligomerització entre molècules de *GlialCAM* *wild-type* es representa com el 100% d'interacció. S'utilitza 4F2hc com a control negatiu. S'indica el % d'interacció de les variants mutants comparades amb la interacció de la proteïna *wild-type* + SEM. S'ha utilitzat el test de comparació *t Student* no aparellada, *** $p < 0.001$. **(A)** Efecte de les mutacions recessives sobre la homooligomerització de *GlialCAM*. Les mutacions R92Q i R98C presenten un defecte d'interacció. **(B)** Efecte de les mutacions dominants sobre la homooligomerització de *GlialCAM*. Les mutacions G89D, G89S i R92W presenten un defecte d'interacció. Dades corresponents a 5-8 experiments independents. En vermell es destaca la mutació estudiada durant aquesta Tesi.

A continuació, es va mesurar la capacitat dels mutants de *GLIALCAM* per heterointeraccionar amb MLC1 i CIC-2 mitjançant la tècnica d'*split*-TEV. Per una banda es va observar com la majoria de mutants de *GlialCAM* presentaven uns nivells d'interacció amb la proteïna MLC1 similars a la proteïna *wild-type*, excepte les mutacions recessives R92Q i R98C, defectives en l'homooligomerització, les quals presentaven una menor interacció (**Figura 30 A**).

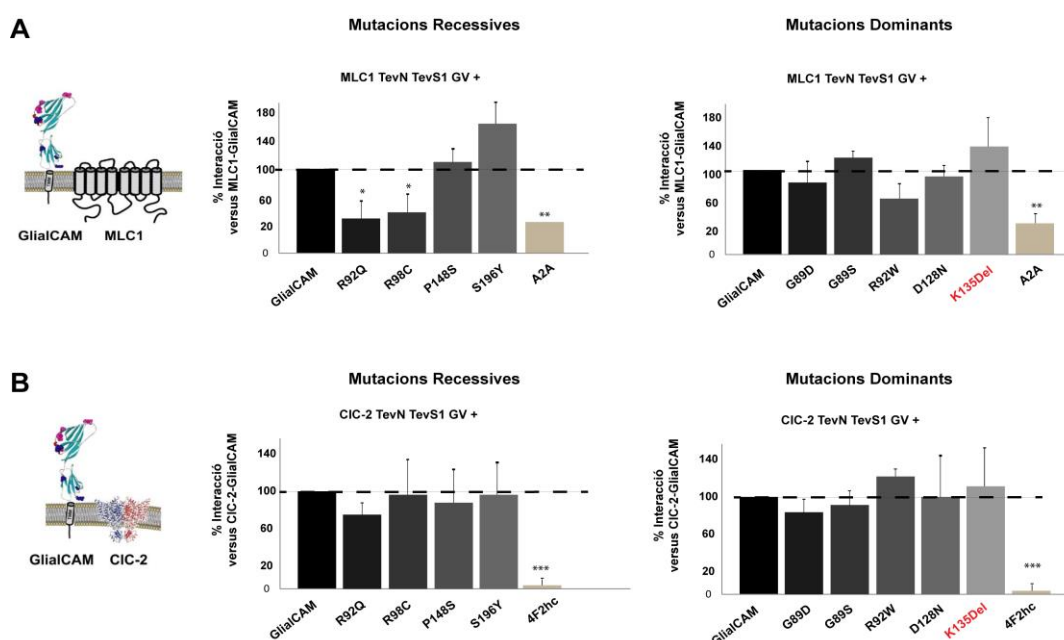


Figura 30. La majoria de mutacions en *GLIALCAM* no presenten defecte en la heterointeracció amb MLC1 o CIC-2. Cèl·lules HeLa es van co-transfectar amb les construccions corresponents i la interacció

es va monitoritzar per mitjà de l'assaig d'*split*-TEV. **(A)** Estudis d'heterointeracció entre GlialCAM i MLC1. La senyal obtinguda per a l'heterooligomerització entre MLC1 i molècules de GlialCAM *wild-type* es representa com el 100% d'interacció. S'utilitza el receptor de membrana A2A com a control negatiu. **(B)** Estudis d'heterointeracció entre GlialCAM i CIC-2. La senyal obtinguda per a l'heterooligomerització entre CIC-2 i molècules de GlialCAM *wild-type* es representa com el 100% d'interacció. S'utilitza 4F2hc com a control negatiu. S'indica el % d'interacció dels mutants comparades amb la interacció de la proteïna *wild-type* + SEM. S'ha utilitzat el test de comparació *t Student* no aparellada; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Dades corresponents a un mínim de 4 experiments independents. En vermell es destaca la mutació estudiada durant aquesta Tesi.

Per altra banda, es va observar que cap dels mutants de GlialCAM no afectava a la capacitat d'interaccionar amb la proteïna CIC-2 respecte la proteïna *wild-type* (**Figura 30 B**).

Gràcies a l'anàlisi dels nivells d'interacció entre molècules de GlialCAM així com la interacció entre GlialCAM i MLC1 o CIC-2 dels mutants de *GLIALCAM* es va poder classificar les mutacions segons si presentaven un defecte en la capacitat de *cis*-homooligomeritzar (**Taula 7**). La majoria de mutacions dominants en *GLIALCAM* presentaven defecte d'homointeracció però aquestes mutacions mantenien la capacitat de formar heterodímers tant amb MLC1 com amb CIC-2. En canvi, algunes de les mutacions recessives eren defectives en la formació d'homodímers així com també en la formació d'heterocomplexes amb MLC1.

CIS-HOMOOLOGOMERITZACIÓ	MUTACIÓ
MENOR INTERACCIÓ	R92Q, R98C (Recessives) G89D, G89S, R92W (Dominants)
NIVELLS SIMILARS A LA PROTEÏNA WILD-TYPE	P148S, S196Y (Recessives) D128N, K135Del (Dominants)

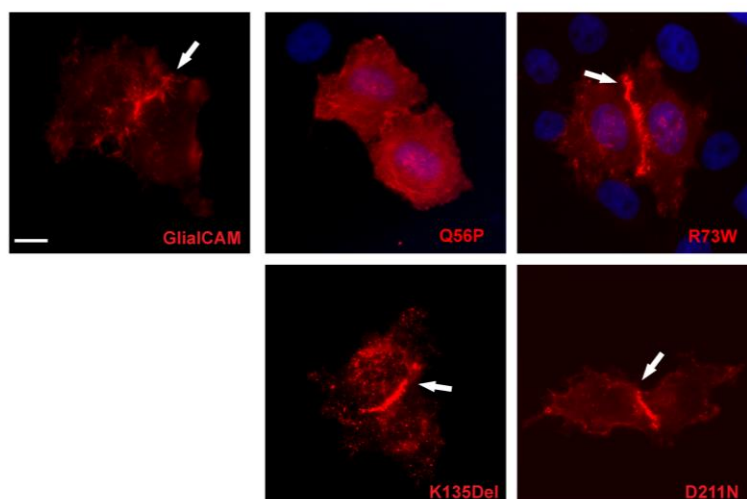
Taula 7. Classificació dels mutants en *GLIALCAM* en funció dels nivells d'homooligomerització.

1.3. EFECTE DE LES MUTACIONS EN *GLIALCAM* EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE GlialCAM, MLC1 i CIC-2.

GlialCAM és una proteïna de membrana que es localitza en les regions d'unió cel·lular quan es troba en contacte amb una altra cèl·lula (López-Hernández et al., 2011a). A continuació, es va voler estudiar el tràfic subcel·lular de GlialCAM mitjançant assaigs d'immunofluorescència. Per analitzar el tràfic de les proteïnes portadores de mutacions en *GLIALCAM* es va comptabilitzar el percentatge de cèl·lules que mostraven un enriquiment de la proteïna a les unions cel·lulars comparant la intensitat de fluorescència en les regions de contacte entre cèl·lules amb la intensitat observada a la membrana que no està en contacte amb cap cèl·lula (veure apartat 2.4.1. de Materials i Mètodes).

Un cop analitzats els resultats obtinguts, es va observar que totes les mutacions dominants en *GLIALCAM* presentaven una dràstica reducció en la localització de la proteïna a les regions de contacte cel·lular, excepte la mutació K135Del que presentava uns nivells similars als de la proteïna *wild-type*, essent fins i tot lleugerament superiors. Un resultat interessant va ser observar que la mutació dominant D128N tot i no presentar defecte en la formació d'homodímers sí que presentava una menor concentració de la proteïna a les unions cel·lulars. En el cas de les mutacions recessives, la majoria de les mutacions no provocaven un defecte en la seva localització subcel·lular, excepte les mutacions R92Q i R98C les quals veien reduïda significativament la quantitat de proteïna localitzada en la regió de contacte entre cèl·lules quedant-se majoritàriament en la membrana cel·lular (Figura 31).

A



B

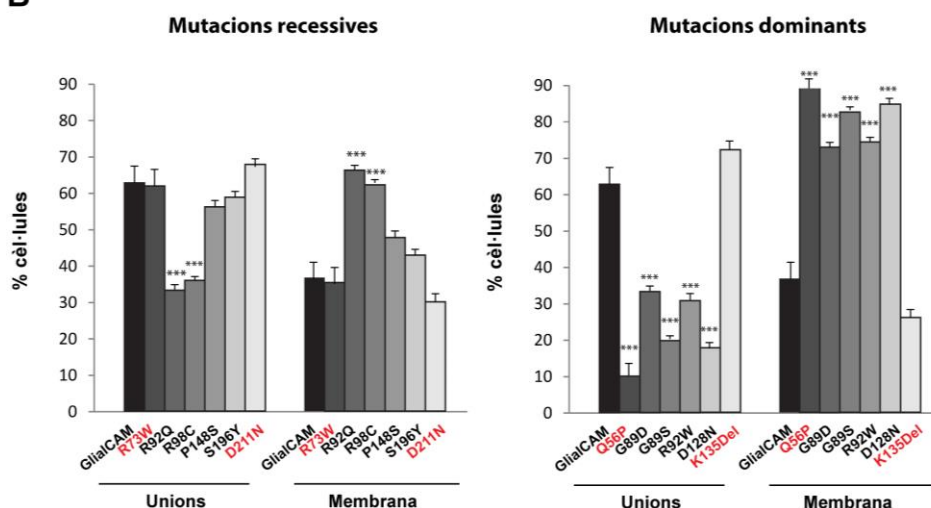


Figura 31. Efecte de les mutacions en *GLIALCAM* en el tràfic cel·lular de la proteïna. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb GlialCAM-Flag *wild-type* o amb les construccions corresponents portadores de les mutacions causants de MLC. Les cèl·lules van ser fixades i permeabilitzades per posteriorment realitzar immunofluorescències utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítip Flag fusionat a GlialCAM.

(A) Es mostren unes imatges representatives de les diferents mutacions en *GLIALCAM*. Les imatges van ser adquirides en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus*. Les fletxes indiquen els contactes cèl·lula-cèl·lula. (B) Parelles de cèl·lules van ser analitzades manualment i quantificades segons si la proteïna es concentrava en unions o es localitzava repartida per tota la membrana plasmàtica (s'empra el programa *Image J* per realitzar l'*intensity profile* i discernir entre les localitzacions esmentades). Dades corresponents a la mitja entre 4-15 experiments independents + SEM. Mutacions recessives (GlialCAM: N=15, 843 cèl·lules; Q56P: N=4, 337 cèl·lules; R73W: N=5, 305 cèl·lules; R92Q: N=5, 744 cèl·lules; R98C: N=5, 644 cèl·lules; S196Y: N=5, 718 cèl·lules; P148S: N=7, 642 cèl·lules; R92W: N=4, 460 cèl·lules; G89D: N=4, 433 cèl·lules; G89S: N=5, 597 cèl·lules; D128N: N=9, 599 cèl·lules; K135Del: N=4, 279 cèl·lules; D211N: N=4, 242 cèl·lules). S'ha utilitzat el test de *t Student* no aparellat, *** $p < 0.005$. Barra: 20 μm . En vermell s'indiquen les mutacions estudiades durant la realització d'aquesta Tesi.

A continuació, tot i no haver observat un defecte clar en el grau d'interacció entre MLC1 o CIC-2 i els mutants de *GLIALCAM* per la tècnica d'*split*-TEV, es va voler estudiar també aquesta interacció per assaigs d'immunofluorescència, coexpressant les diferents proteïnes portadores de mutacions en *GLIALCAM* tant amb hMLC1 com amb CIC-2-HA per estudiar el seu tràfic cel·lular.

La proteïna MLC1 en condicions normals es troba localitzada a la membrana cel·lular. En canvi, quan és coexpressada amb GlialCAM, aquesta última dirigeix el tràfic de MLC1 a les unions entre cèl·lules (López-Hernández et al., 2011b). Després de realitzar l'assaig d'immunofluorescència es va observar que al coexpressar MLC1 amb els mutants de GlialCAM, la localització de MLC1 en unions cel·lulars era defectiva en aquelles mutacions que provocaven un defecte de tràfic de GlialCAM. En canvi, la resta de mutants no mostrava cap defecte en comparació amb la proteïna *wild-type* (Figura 32 A,C).

A diferència de la proteïna MLC1, CIC-2 *per se*, tot i que arriba a la membrana, es localitza majoritàriament retinguda citoplasmàticament i quan es coexpressa amb GlialCAM aquest és capaç de dirigir CIC-2 a les unions cel·lulars (Jeworutzki et al., 2012). Quan es va analitzar l'efecte dels mutants de GlialCAM en el tràfic de CIC-2 es va observar que, al igual que amb la proteïna MLC1, el defecte observat en la localització de GlialCAM per les mutacions recessives R92Q i R98C i la majoria de mutacions dominants, tot i no presentar defecte en la formació d'heterodímers, anava acompanyat d'una dràstica reducció de CIC-2 en les unions cel·lulars. (Figura 32 B,D). Aquests resultats suggereixen que per a que GlialCAM pugui actuar com a subunitat β de MLC1 o subunitat auxiliar de CIC-2 modificant el seu tràfic cel·lular, és necessària la correcta localització de GlialCAM a les unions cel·lulars.

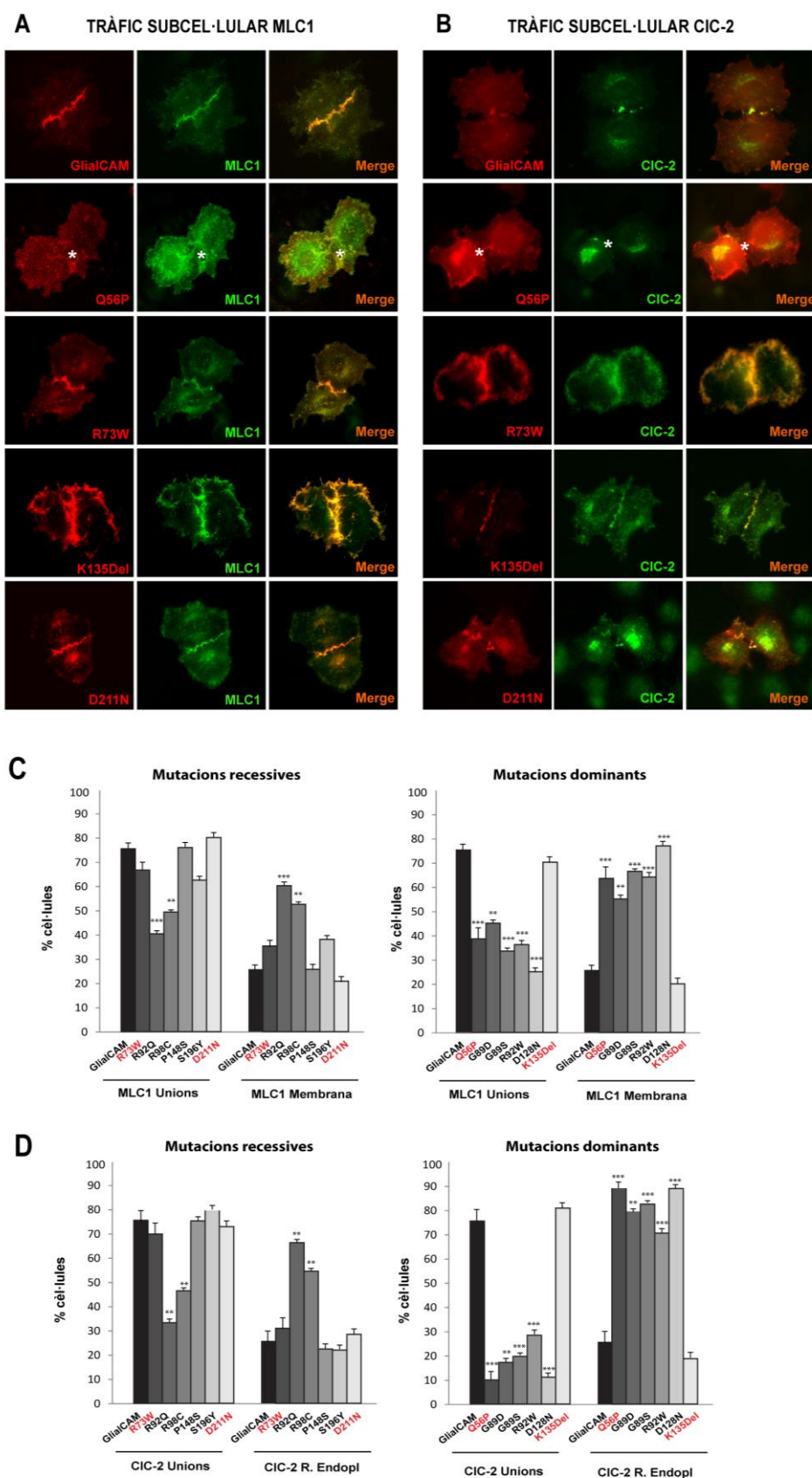


Figura 32. La localització subcel·lular de MLC1 i CIC-2 depèn de la localització dels mutants de *GLIALCAM*. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb hMLC1 o CIC-2-HA i GlialCAM-Flag *wild-type* o amb els plasmidis portadors de mutacions en *GLIALCAM* causants de MLC. 48hores després, les cèl·lules van ser fixades i permeabilitzades. Es va realitzar un assaig d'immunofluorescència utilitzant un

anticòs monoclonal contra l'epítóp Flag fusionat a GlialCAM (vermell) i un anticòs policlonal contra hMLC1 (verd) **(A)** o un anticòs policlonal contra CIC-2 (verd) **(B)**. La colocalització entre ambdues proteïnes es mostra en groc (Merge). L'asterisc indica la deslocalització de la proteïna. **(C)** i **(D)** Parelles de cèl·lules van ser analitzades manualment i quantificades segons si MLC1 **(C)** es concentrava en unions o es localitzava repartida per tota la membrana plasmàtica o CIC-2 **(D)** es concentrava en unions o es localitzava intracel·lularment (s'empra el programa *Image J* per realitzar l'*intensity profile* i discernir entre les localitzacions esmentades). Les dades corresponen a 4-11 experiments independents + SEM. (GlialCAM: N=11,656 cèl·lules; Q56P: N=7, 300 cèl·lules; R73W: N=9, 307 cèl·lules; R92Q: N=5, 697 cèl·lules; R98C: N=5, 688 cèl·lules; S196Y: N=4, 281 cèl·lules; P148S: N=4, 332 cèl·lules; R92W: N=4, 455 cèl·lules; G89D: N=4, 444 cèl·lules; G89S: N=5, 344 cèl·lules; D128N: N=5, 264 cèl·lules; K135Del: N=9, 473 cèl·lules; D211N: N=4, 247 cèl·lules). S'ha utilitzat el test estadístic *t Student* no aparellat comparant la localització de MLC1 cotransfectat amb la proteïna *wild-type* respecte les variants mutades. **p<0.001, ***p<0.005. Barra: 20 µm. En vermell s'indiquen les mutacions estudiades durant la realització d'aquesta Tesi.

Gràcies a l'anàlisi del tràfic subcel·lular dels mutants de *GLIALCAM* es va poder classificar les mutacions en funció de la localització de la proteïna en les unions cel·lulars. Aquelles mutacions que presentaven un defecte en la *cis*-homooligomerització també mostraven una menor arribada a les unions cel·lulars (**Taula 8**).

TRÀFIC A UNIONS CEL·LULARS	MUTACIÓ
MENOR ARRIBADA	R92Q, R98C (Recessives) Q56P, G89D, G89S, R92W, D128N (Dominants)
NIVELLS SIMILARS A LA PROTEÏNA <i>WILD-TYPE</i>	R73W, P148S, S196Y (Recessives) K135Del (Dominants)

Taula 8. Classificació dels mutants en *GLIALCAM* en funció del seu tràfic a les unions cel·lulars.

1.4. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DE LES MUTACIONS EN *GLIALCAM* EN CULTIUS PRIMARIS D'ASTRÒCITS DE RATA.

Un cop realitzats els estudis bioquímics en cèl·lules HeLa, es va decidir dur a terme el mateix tipus d'estudi en un sistema cel·lular més proper al real, com és el cultiu primari d'astròcits, ja que tant GlialCAM com MLC1 i CIC-2 s'expressen de manera endògena. En el cas de GlialCAM i MLC1, ambdós es localitzen en unions astrocitàries (Duarri et al., 2011) mentre que CIC-2, en canvi, es localitza en l'espai intracel·lular, al voltant del nucli.

Per a poder realitzar aquests estudis, es van construir adenovirus per a GlialCAM i per a les mutacions K135Del i D211N amb un epítóp Flag fusionat. En primera instància es va observar que la infecció amb els mutants de GlialCAM presentaven uns nivells proteics similars als observats en la proteïna *wild-type*, així com succeïa en cèl·lules HeLa (**Figura 33**).

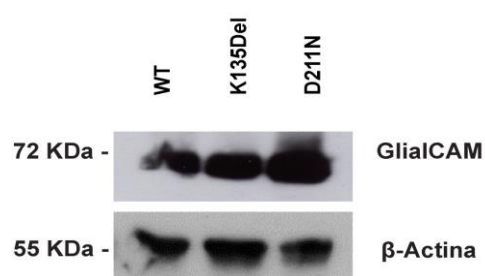


Figura 33. Nivell d'expressió de proteïnes portadores de mutacions en *GLIALCAM* en un cultiu d'astròcits primaris de rata. Imatges representativa dels nivells proteics de GlialCAM observats en la infecció d'astròcits de rata. Es van infectar astròcits primaris amb adenovirus que expressaven les construccions corresponents i passades 48 hores es van realitzar extractes proteics que es van analitzar posteriorment per WB. S'utilitza β -actina com a control de càrrega. Dades corresponents a 3 experiments independents.

De la mateixa manera que en cèl·lules HeLa, es va estudiar la localització dels mutants de *GLIALCAM* per assaigs d'immunofluorescència en astròcits de rata. Es va observar que en la majoria de les mutacions es detectava la proteïna deslocalitzada respecte la proteïna *wild-type*, ja que tot i que en ocasions eren capaces d'arribar a la membrana plasmàtica, no eren capaces de concentrar-se a les unions astrocitàries (Figura 34). Novament no es va observar defecte de tràfic per a les mutacions recessives P148S, S196Y i D211N així com per la mutació dominant K135Del.

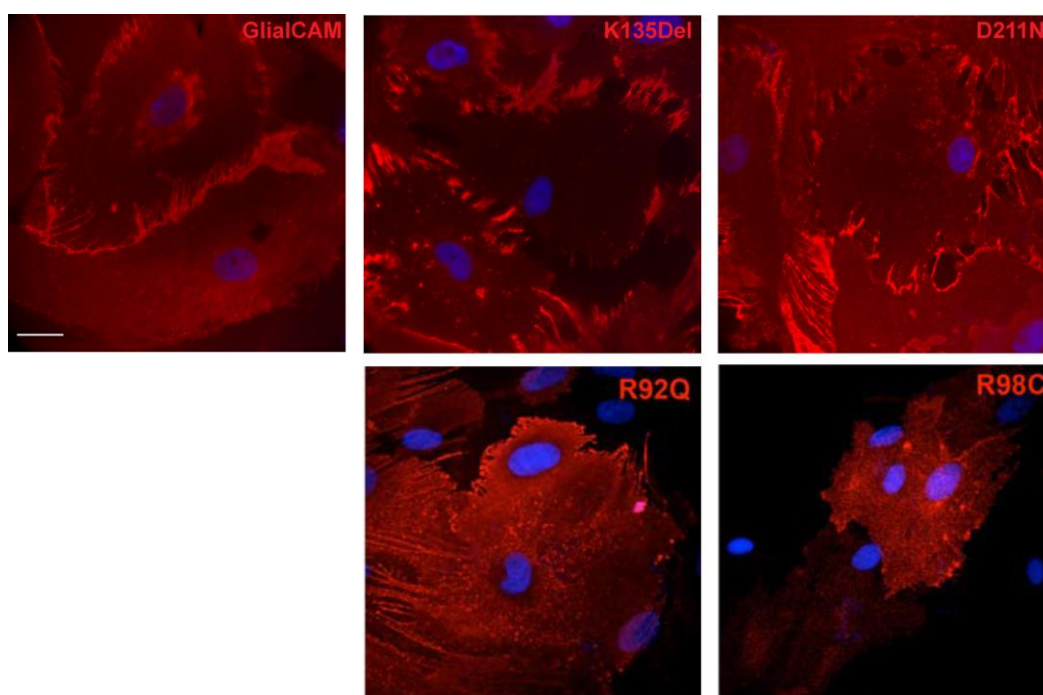


Figura 34. Localització subcel·lular de les proteïnes mutades de *GLIALCAM* associades a MLC en astròcits primaris de rata. Imatges representatives d'astròcits infectats amb adenovirus que expressaven GlialCAM *wild-type* o alguna de les proteïnes mutades a MOI2 (*multiplicity of infection*). Les cèl·lules van ser fixades i permeabilitzades per a poder realitzar immunofluorescències fent servir un anticòs monoclonal contra l'epítip Flag fusionat a GlialCAM. Les imatges es van adquirir en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus* i són representatives de 4-5 experiments independents. Barra: 40 μ m. Es mostren les mutacions estudiades durant la realització d'aquesta Tesi, K135Del i D211N.

Posteriorment, es va voler estudiar també si el tràfic de MLC1 i CIC-2 es veia alterat quan era coinfectat amb les proteïnes portadores de mutacions en *GLIALCAM*. Es va poder observar com, altre cop, MLC1 seguia el tràfic de les mutacions de GlialCAM, ja que no era capaç de concentrar-se en les unions cel·lulars quan la localització de GlialCAM es veia alterada. De la mateixa manera, no es va observar defecte en MLC1 quan era coinfectada amb les mutacions P148S, S196Y, K135Del i D211N (**Figura 35 A**).

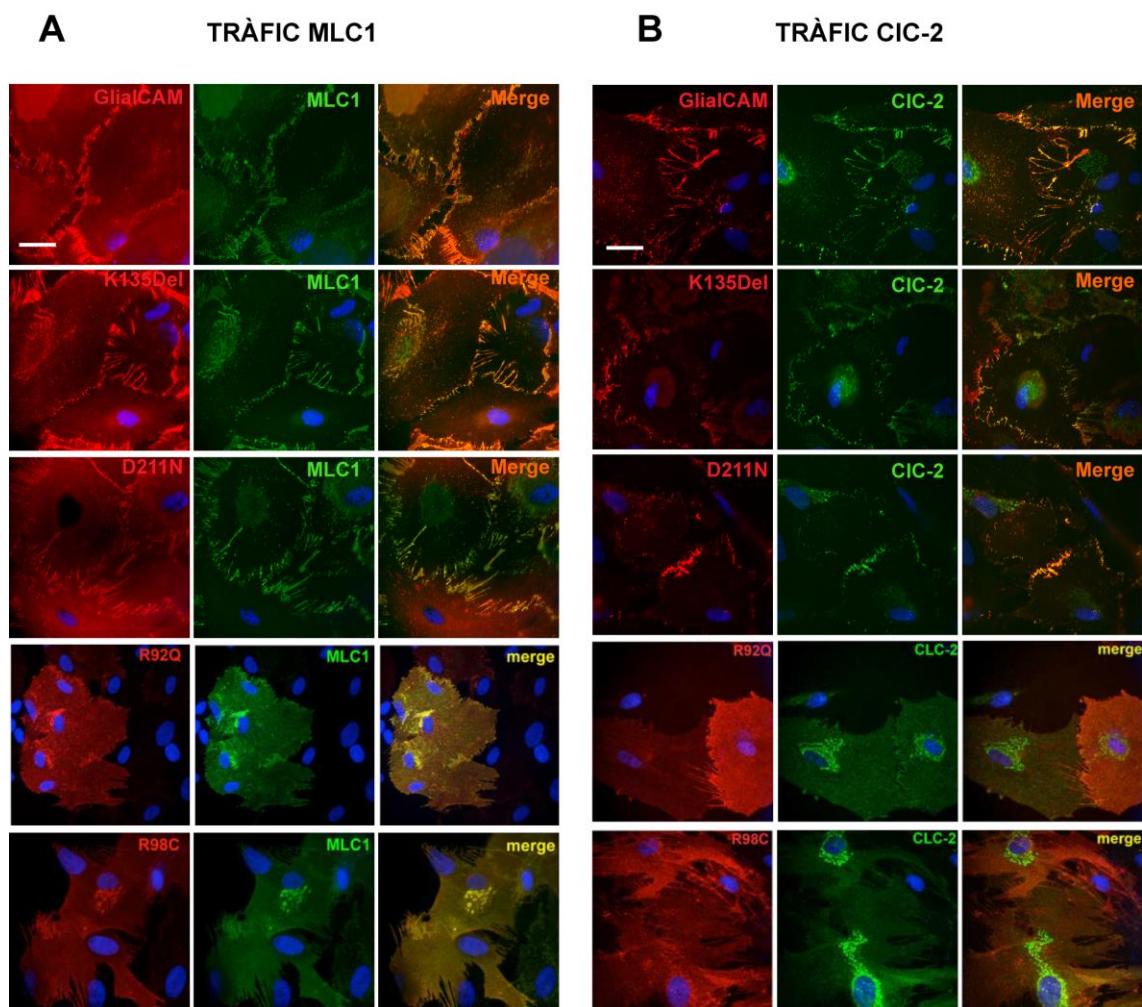


Figura 35. MLC1 i CIC-2 veuen alterat el seu tràfic cel·lular quan són coinfectades amb els mutants de GlialCAM. Astròcits coinfectats amb adenovirus que expressaven MLC1 o CIC-2 conjuntament amb GlialCAM *wild-type* o alguns mutants de GlialCAM a MOI2, van ser fixades i permeabilitzades per realitzar un assaig d'immunofluorescència fent servir un anticòs monoclonal contra l'epítip Flag fusionat a GlialCAM (vermell) i un anticòs policlonal contra MLC1 (verd) (**A**) o un anticòs policlonal contra CIC-2 (verd) (**B**). La colocalització entre ambdues proteïnes es mostra en groc (Merge). Les imatges es van adquirir en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus* i són representatives d'un mínim de 3 experiments independents. Barra: 40 μ m. Es mostren les mutacions estudiades durant la realització d'aquesta Tesi, K135Del i D211N.

En astròcits en cultiu, CIC-2 es detecta majoritàriament a l'interior cel·lular, sobretot agregat al voltant del nucli (Jeworutzki et al., 2012). La coinfecció amb adenovirus de sobreexpressió de CIC-2 i GlialCAM, provoca la modificació del tràfic de CIC-2 localitzant-se majoritàriament en unions astrocitàries, tot i que sempre queda un romanent de proteïna retinuda al voltant del nucli (Jeworutzki et al., 2012). Quan es va estudiar l'efecte de les diferents mutacions en *GLIALCAM* sobre el tràfic de CIC-2 es va observar com, al igual que amb la proteïna MLC1, CIC-2 requeria de la correcta localització de GlialCAM en les unions astrocitàries per a modificar el seu tràfic cel·lular. Així doncs, cap dels mutants defectius de GlialCAM dirigia a CIC-2 a les regions de contacte entre cèl·lules. Novament, no es va observar cap defecte en les mutacions S196Y, P148S, K135Del i D211N (**Figura 35 B**).

1.5. COMPLEMENTACIÓ DEL MODEL *KNOCK-DOWN* DE *GLIALCAM* AMB LES MUTACIONS ASSOCIADES A MLC.

S'ha descrit que les mutacions dominants i recessives en *GLIALCAM* es diferencien bioquímicament pel fet que al coinfectar les proteïnes mutades amb la proteïna *wild-type*, aquesta és capaç de recuperar el defecte de tràfic causat per les mutacions recessives però no pas per les mutacions dominants (López-Hernández et al., 2011a). Tot i així, encara no érem capaços d'entendre perquè les mutacions dominants i recessives donaven els mateixos defectes; per què dins de les mutacions dominants o recessives no totes les mutacions presentaven el mateix defecte així com tampoc enteníem quin defecte presentaven les mutacions P148S, S196Y, K135Del i D211N. A continuació, es va voler estudiar si el defecte que presentaven aquestes quatre mutacions es donava quan la proteïna *wild-type* no era present en la cèl·lula.

Aquests estudis es van realitzar mitjançant la complementació de les quatre mutacions en el model *knock-down* de *GLIALCAM* generat prèviament en el grup (Capdevila-Nortes et al., 2013). Es van infectar els astròcits amb miRNA de GlialCAM a MOI 10 (*multiplicity of infection*) durant 7 dies, condicions òptimes en les que s'aconsegueix suprimir un 80% dels nivells proteics de GlialCAM, i es van sobreexpressar les proteïnes mutants mitjançant la seva infecció a MOI 2, mantenint el cultiu durant 48 hores per obtenir una correcta expressió i localització de la proteïna sobreexpressada.

Resultats previs mostren com la manca de GlialCAM és recuperada per la complementació del model *knock-down* amb la proteïna *wild-type*. Per altra banda, s'ha observat que la manca de GlialCAM provoca una dràstica reducció en els nivells proteics de MLC1, i que aquesta disminució era revertida també gràcies a la

sobreexpressió de GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013). Així doncs, primer de tot es van analitzar els nivells d'expressió proteica de GlialCAM i MLC1 en les diferents complementacions. En el cas de la proteïna GlialCAM es va observar que la sobreexpressió de les diferents proteïnes mutades recuperava la seva expressió proteica. De la mateixa manera que la proteïna *wild-type*, els mutants de GlialCAM també eren capaços de revertir la reducció dels nivells proteics de MLC1 provocada per la manca de GlialCAM (**Figura 36**).

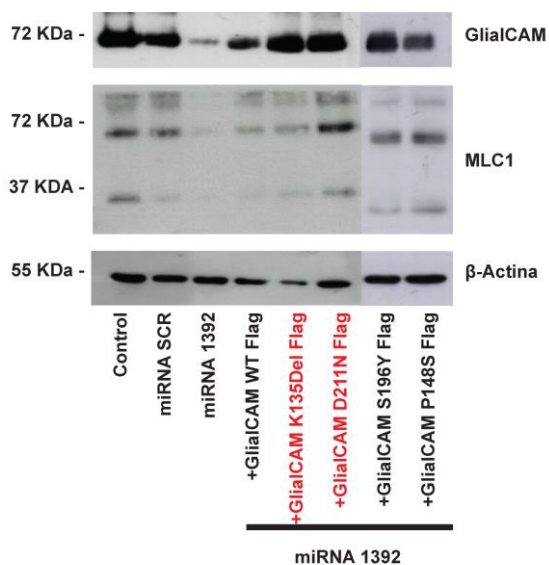


Figura 36. L'expressió proteica de GlialCAM és recuperada per la complementació del model *knock-down* de *GLIALCAM* amb els mutants associats a MLC. Astròcits primaris de rata sense infectar (Control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA GlialCAM a MOI10 durant 7 dies o miRNA GlialCAM a MOI10 durant 7 dies complementat amb GlialCAM Flag o els diferents mutants descrits en la figura, infectats a MOI2 durant 2 dies. S'utilitza β-actina com a control de càrrega. Dades corresponents als següents experiments: GlialCAM, N=6; MLC1, N=5. En vermell es destaquen les mutacions estudiades en aquesta Tesi.

S'ha observat en el model *knock-down* de *GLIALCAM* que la manca de GlialCAM provoca, a part de la caiguda significativa dels nivells proteics tant de GlialCAM com de MLC1, la deslocalització de MLC1 endògena, ja que la seva localització a la membrana i a les unions cel·lulars es veu modificada per una localització intracel·lular difusa i concentrada al voltant del nucli. De la mateixa manera que els nivells d'expressió proteics, la incorrecta localització de MLC1 es veu recuperada quan es sobreexpressa la proteïna GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013).

Els estudis de complementació del model *knock-down* de *GLIALCAM* van mostrar que, tal i com s'havia descrit prèviament, la manca de GlialCAM no afectava la localització a la membrana o a les unions cel·lulars de la proteïna humana GlialCAM sobreexpressada. Així com la proteïna *wild-type*, cap de les mutacions en *GLIALCAM* veia afectada la seva localització per la manca de GlialCAM endogen (**Figura 37 A**).

Quan es va estudiar com afectava la complementació dels mutants a la deslocalització de MLC1 endògena causada per la manca de GlialCAM es va observar que també aquests eren capaços de recuperar la correcta localització de MLC1 de manera similar a la proteïna *wild-type* (**Figura 37 B**).

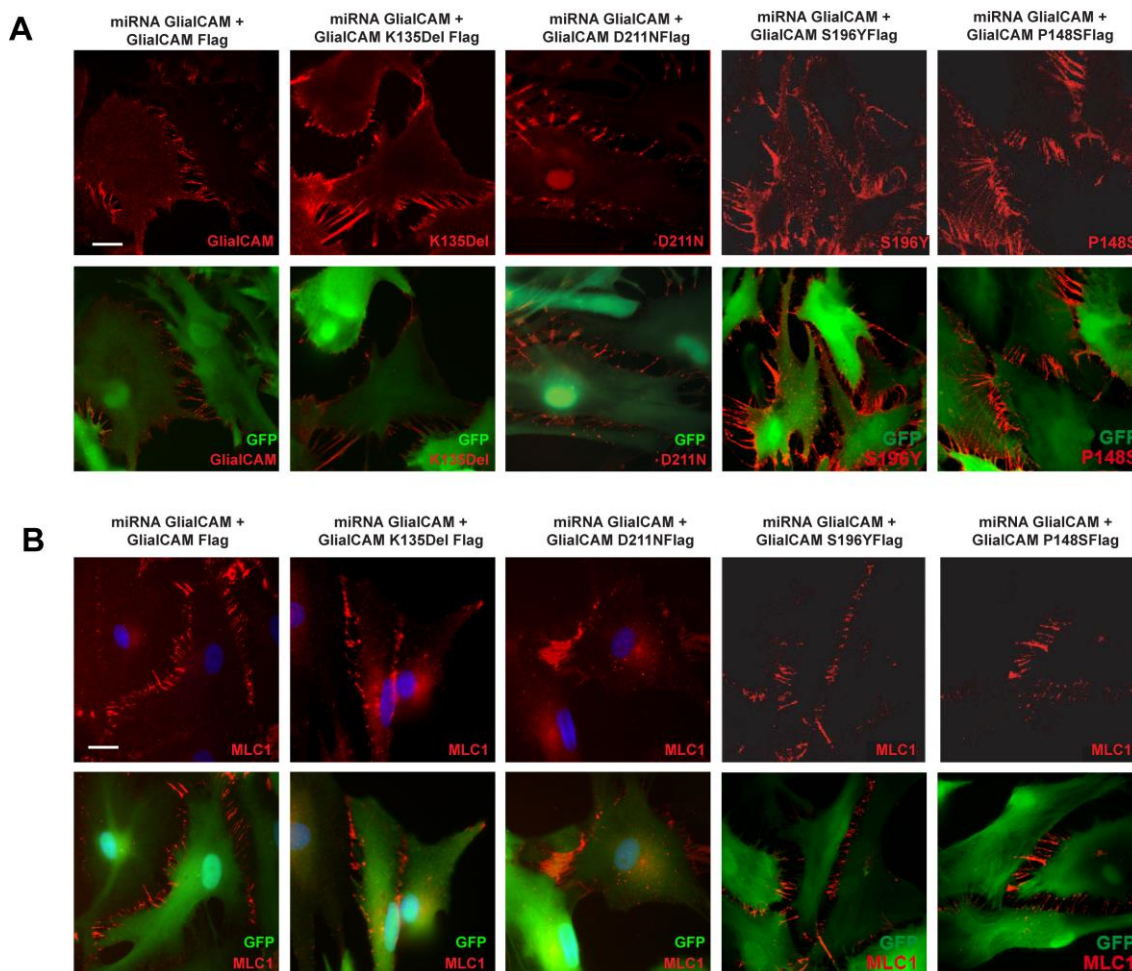


Figura 37. Estudi de la localització de les proteïnes sobreexpressades i de MLC1 endogen en les complementacions del model *knock-down* de *GLIALCAM*. Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA GlialCAM a MOI 10 durant 7 dies complementats amb GlialCAM Flag, o els mutants S196Y, P148S, K135Del i D211N fusionats a l'epítot Flag i infectats a MOI 2 durant 2 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta cada proteïna sobreexpressada (en vermell) amb un anticòs comercial contra l'epítot Flag de GlialCAM **(A)** o amb un anticòs contra la part N-terminal de MLC1 de ratolí (vermell) **(B)**. Es mostra la marca obtinguda (vermell) detectant la proteïna i la senyal GFP que identifica els astròcits que expressen el miRNA de GlialCAM. Dades corresponents a 5 experiments independents. Barra: 40µm. Es mostren els mutants estudiats durant aquesta Tesi, K135Del i D211N, juntament amb els mutants analitzats per el Dr. Xavier Capdevila, S196Y i P148S.

1.5.1. Caracterització fenotípica del model *knock-down* de *GLIALCAM* complementat amb els mutants associats a MLC.

S'ha descrit que l'absència de GlialCAM, a part de provocar la disminució de l'expressió i la deslocalització de MLC1, provoca també una disminució de l'activitat VRAC i l'aparició de vacuoles intracel·lulars (Capdevila-Nortes et al., 2013). Aquest fenotip vacuolitzant observat en cultiu d'astròcits era similar a les vacuoles observades en els pacients afectats per la MLC, ja sigui causada per mutacions en *MLC1* com en *GLIALCAM*. Així doncs, quan MLC1 es troba absent, a causa de mutacions en *MLC1*, o deslocalitzat, a causa de mutacions en *GLIALCAM*, provoca un defecte en el

mecanisme RVD que implica un augment del contingut d'aigua intracel·lular. S'ha proposat que les cèl·lules astrocitàries intenten combatre aquest augment del contingut d'aigua dins la cèl·lula mitjançant l'emmagatzematge d'aquesta en vacuoles intracel·lulars.

En el model astrocitari *knock-down* de *GLIALCAM* desenvolupat en el grup, les cèl·lules infectades que expressen els miRNAs també expressen la proteïna fluorescent GFP de forma constitutiva i d'aquesta manera es pot observar la presència de vacuoles intracel·lulars en els astròcits. Per a poder quantificar aquest fenotip vacuolitzant, es va determinar que una cèl·lula presentava vacuoles o fenotip vacuolitzant quan presentava 3 o més vacuoles intracel·lulars amb un diàmetre major a 1 µm.

S'ha observat que la infecció amb el miRNA SCR provoca l'aparició d'un petit percentatge de cèl·lules amb vacuoles, probablement degut a l'efecte tòxic que representa per la cèl·lula el procés d'infecció per adenovirus. Tot i aquest *background*, l'eliminació de GlialCAM per part del miRNA provocava un augment significatiu de cèl·lules amb vacuoles fins al 30%. El fenotip vacuolitzant observat en el model *knock-down* era específicament causat per la manca de GlialCAM endogen, ja que la complementació amb la proteïna *wild-type* feia recuperar el percentatge de cèl·lules amb vacuoles fins als nivells control (Capdevila-Nortes et al., 2013).

Primer de tot, es va intentar reproduir el model *knock-down* i es va observar que la supressió de GlialCAM provocava un augment significatiu del nombre de cèl·lules que presentaven vacuoles respecte els astròcits infectats amb el miRNA SCR. Per tant, érem capaços de generar el fenotip vacuolitzant causat per la manca de GlialCAM.

Així com en el model *knock-down* de GlialCAM descrit prèviament, es va observar que la complementació amb la proteïna humana de GlialCAM recuperava l'aparició de les vacuoles astrocitàries fins als nivells control (**Figura 38**). Quan es va complementar el model amb els mutants no defectius de GlialCAM es va observar que en aquest cas tampoc mostraven defecte en la recuperació del fenotip vacuolitzant causat per la manca de GlialCAM endogen, una millora que en el cas del mutant dominant K135Del fins i tot representava una major recuperació del fenotip vacuolitzant respecte la proteïna *wild-type* (**Figura 38**).

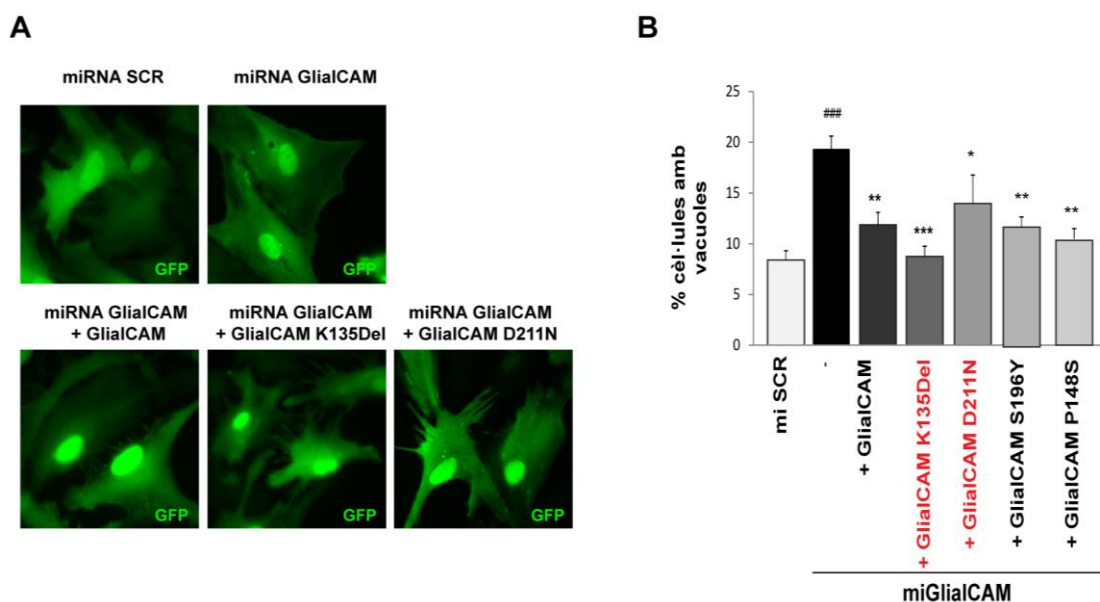


Figura 38. Caracterització fenotípica de les complementacions del model *knock-down* de GlialCAM. (A) Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA GlialCAM a MOI 10 durant 7 dies o les respectives complementacions amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag, GlialCAM K135Del-Flag i GlialCAM D211N-Flag a MOI 2 durant 2 dies. (B) Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major a 1 µm de diàmetre en les complementacions amb els diferents mutants de GlialCAM. Dades corresponents a 6 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=748), miRNA GlialCAM (n=1015), miRNA GlialCAM + GlialCAM WT (n=920), miRNA GlialCAM + GlialCAM K135Del (n=567), miRNA GlialCAM + GlialCAM D211N (n=514). *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.005 respecte miRNA GlialCAM. ### p<0.005 respecte miRNA SCR; *t Student* no aparellada. Les mutacions estudiades durant aquesta Tesi es destaquen en vermell.

Atès que cap dels 4 mutants de GlialCAM no presentava un defecte en la recuperació de la proteïna endògena així com de MLC1 i també recuperaven el fenotip vacuolitzant provocat per la manca de GlialCAM, encara no entenim quin defecte provocaven aquestes mutacions per a desenvolupar la malaltia.

1.6. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS MUTANTS DE GLIALCAM ASSOCIATS A MLC.

Estudis electrofisiològics prèviament realitzats en el grup mostren com GlialCAM incrementa les corrents regulades per ClC-2 (tant en oòcits de *Xenopus*, com en cèl·lules HEK transfectades i en astròcits de rata diferenciats). GlialCAM també modifica les propietats funcionals del canal ClC-2, alterant les seves propietats d'activació i rectificació, permetent un major flux de clorur a voltatges positius (Jeworutzki et al., 2012).

En col·laboració amb la Dra. Elena Jeworutzki i el Dr. Michael Pusch, de l'institut de Biofísica de Gènova, es va analitzar l'efecte de les mutacions en *GLIALCAM* en la

modificació de les propietats funcionals de CIC-2. Aquests estudis funcionals es van realitzar mitjançant assaigs *Patch-clamp* en cèl·lules HEK.

L'expressió de les proteïnes mutades de GlialCAM provocava un efecte similar sobre CIC-2 respecte la proteïna *wild-type*, capaces de modificar les traces de les corrents regulades per CIC-2 (**Figura 39 A**). També es va realitzar un estudi electrofisiològic de la cinètica de desactivació del canal CIC-2 a voltatges positius (+60 mV), comparant la intensitat de la corrent obtinguda en l'estat d'equilibri (*steady state*) respecte la màxima intensitat obtinguda, després d'un pols prolongat hiperpolaritzant de -140 mV. Aquesta relació era petita quan s'expressava el canal CIC-2 per si sol, i augmentava considerablement en les corrents obtingudes en la coexpressió de CIC-2 amb GlialCAM *wild-type* o amb els mutants Q56P i R73W (**Figura 39 B**). Tot i que la variant Q56P provocava una dràstica reducció en els nivells de GlialCAM i CIC-2 en les unions cel·lulars, era capaç de generar els mateixos canvis en l'activitat del canal respecte la proteïna *wild-type*.

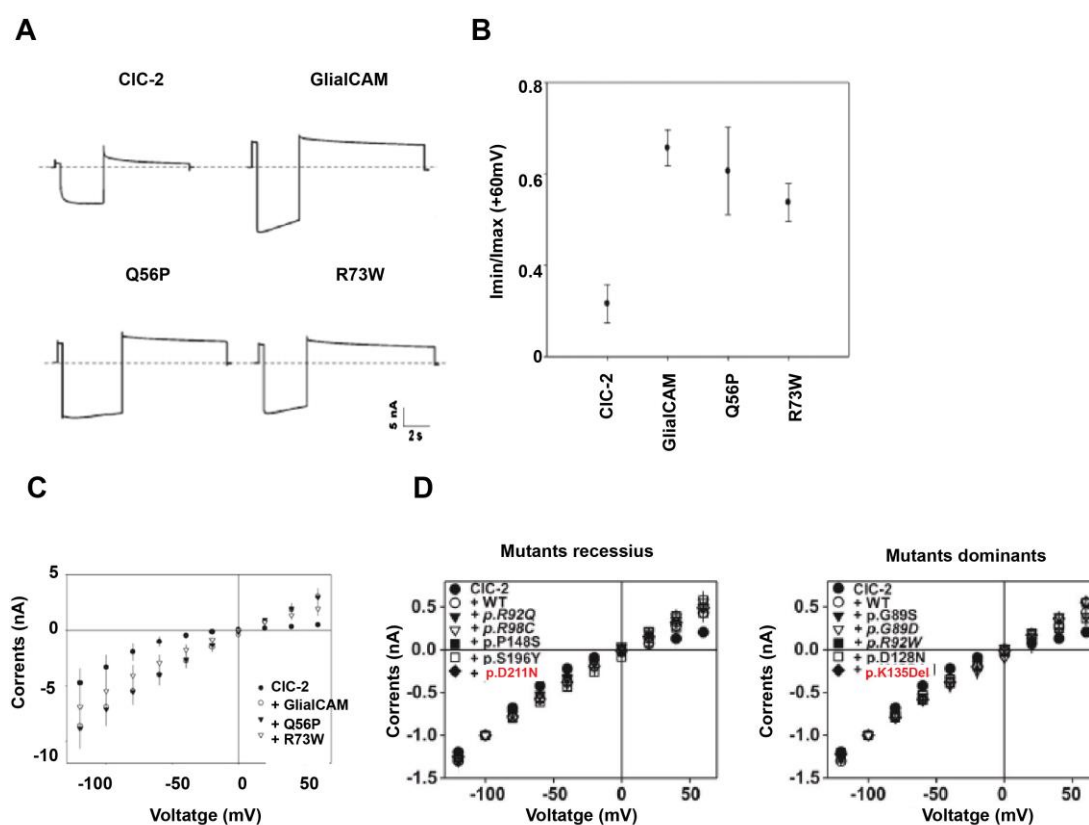


Figura 39. Les propietats funcionals d'activació i rectificació de CIC-2 per GlialCAM no es veuen alterades per les mutacions en GLIALCAM. (A) Exemples de traces de les corrents de CIC-2 sol o co-expressat amb GlialCAM *wild-type* o les variants Q56P i R73W en cèl·lules HEK. (B) Es representa la cinètica de desactivació del canal a +60 mV calculada amb la relació entre la corrent obtinguda a *steady State* i la corrent màxima ($n > 6 + \text{SEM}$ experiments independents per condició). (C i D) Relació Corrent-

Voltatge promig en *Steady State* normalitzades en cèl·lules HEK transfectades amb CIC-2 o cotransfectades amb les variants Q56P i R73W (**C**) o amb la resta de mutacions descrites (**D**). Dades corresponents de 6 a 8 mesures. No es troben diferències significatives entre les variants mutades i la proteïna *wild-type*.

Quan es va analitzar la relació entre el voltatge administrat i la corrent registrada del canal CIC-2 en coexpressió amb els mutants de GlialCAM, no es va observar diferències en la conductància així com en la rectificació del canal en comparació amb la proteïna *wild-type* (**Figura 39 C, D**). En la figura D es representen totes les variants de GlialCAM estudiades fins el moment i en vermell es remarquen les variants estudiades durant aquesta Tesi.

Així doncs, aquests resultats demostraven que tot i que la majoria de mutacions en *GLIALCAM* presenten defecte a l'hora de dirigir la proteïna CIC-2 a les unions cel·lulars, cap de les mutacions associades a MLC provocaven un defecte en la modificació funcional del canal CIC-2.

1.7. ESTUDI DEL COMPORTAMENT DE LES MUTACIONS EN *GLIALCAM* EN EL RATOLÍ *KNOCK-OUT* DE MLC1.

S'ha descrit recentment que en astròcits en presència d'altres concentracions de K^+ , la manca de MLC1 provoca la internalització de la proteïna GlialCAM (Sirisi et al., 2014). Aquest fet demostrava que no només MLC1 depenia de GlialCAM sinó que aquest també depenia de MLC1 per a la seva estabilització a la membrana cel·lular. Així doncs, a continuació ens vam plantejar si les mutacions en *GLIALCAM* que no presentaven cap defecte bioquímic podrien ser sensibles a la presència d'altres concentracions de K^+ quan MLC1 no hi era present.

Per a realitzar aquests estudis en el model *knock-out* de MLC1 es va escollir les diferents mutacions dominants (K135Del) i recessives (P148S, S196Y i D211N) que no presentaven cap defecte bioquímic ni funcional. Aquestes mutacions es van infectar en astròcits aïllats de ratolí *wild-type* i *knock-out* mitjançant adenovirus de sobreexpressió 48 hores abans de realitzar el tractament. Posteriorment, passat el temps necessari perquè les cèl·lules haguessin sobreexpressat la proteïna, es va analitzar la seva localització mitjançant un assaig d'immunofluorescència.

Primer de tot es va observar que, com en resultats previs, GlialCAM es trobava deslocalitzat només quan els astròcits del ratolí *knock-out* de MLC1 eren tractats amb el medi d'alta concentració de K^+ . Un resultat molt interessant va ser el cas del mutant recessiu P148S en el qual es va observar que la manca de MLC1 provocava la seva

internalització tant en condicions fisiològiques com en presència d'altres concentracions de K^+ . En canvi, a diferència de la proteïna *wild-type*, la resta de mutacions (K135Del, S196Y i D211N) no presentaven cap alteració en la seva localització cel·lular en els astròcits *knock-out* de MLC1 en condicions d'alta concentració de K^+ , detectant-les a la membrana plasmàtica (Figura 40).

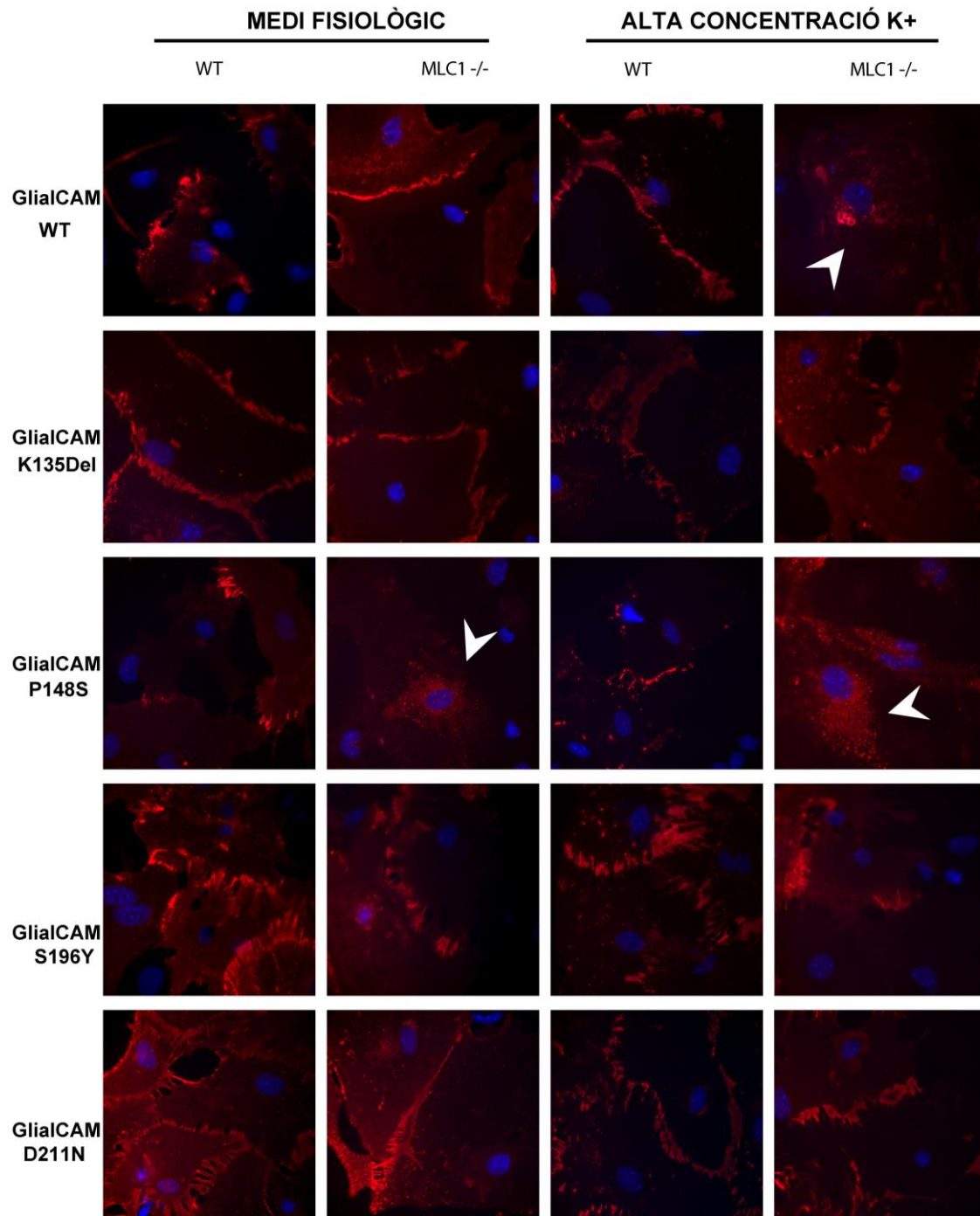


Figura 40. Estudi de la localització de diferents mutants de GlialCAM en el cultiu primari d'astròcits de ratolí *knock-out* tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ . Astròcits de ratolí *wild-type* (WT) i *knock-out* (MLC1 -/-) infectats amb adenovirus que expressen GlialCAM-Flag *wild-type* o variants mutades. 48 hores més tard es va tractar amb un medi fisiològic o amb un medi d'alta concentració de K^+ durant 6

hores. Es detecta la proteïna GlialCAM utilitzant un anticòs contra l'epítot Flag fusionat a la proteïna (vermell). Les fletxes indiquen la proteïna deslocalitzada. Dades corresponents a 4 experiments independents. Barra: 20 μm .

Aquests resultats demostraven que l'estabilitat de la proteïna mutada P148S depenia de la presència de MLC1 en la cèl·lula. En canvi, les mutacions K135Del, S196Y i D211N presentaven un comportament diferent al de la proteïna *wild-type* localitzant-se a la membrana plasmàtica en absència de MLC1 sota condicions d'alta concentració de K^+ . Pot ser que aquestes mutacions que no depenen de MLC1, representin un guany de funció per a la cèl·lula o que per el contrari, aquesta manca d'internalització en condicions d'alta concentració de K^+ impliqui un defecte funcional de la proteïna mutada.

Gràcies a l'anàlisi del tràfic subcel·lular dels mutants de *GLIALCAM* en astròcits derivats de ratolins *knock-out* per MLC1 i estimulats amb un medi d'alta concentració de K^+ podem classificar les mutacions segons si presenten un defecte en la seva localització o internalització. (**Taula 9**).

TRÀFIC SUBCEL·LULAR	MUTACIÓ
MENOR TRÀFIC A LA MEMBRANA EN ASTRÒCITS <i>Mlc1</i> ^{-/-}	P148S (Recessiva)
NO INTERNALITZACIÓ EN ASTRÒCITS <i>Mlc1</i> ^{-/-} EN PRESÈNCIA D'ALT K^+	S196Y, D211N (Recessives) K135Del (Dominant)

Taula 9. Classificació dels mutants en *GLIALCAM* en funció del tràfic cel·lular en astròcits *Mlc1*^{-/-}.

Així doncs, la concentració de tota la informació obtinguda a partir de tots els estudis bioquímics i funcionals realitzats en les diferents mutacions en *GLIALCAM* prèviament descrites juntament amb les mutacions estudiades al llarg d'aquesta Tesi va permetre que fóssim capaços de suggerir una classificació per a la majoria de les mutacions descrites en GlialCAM en funció del defecte que presentaven (**Taula 10**). Estudis preliminars d'homointeracció així com d'immunocitoquímica per avaluar el tràfic cel·lular de GlialCAM mostren com les mutacions Q56P i S59N (una nova mutació descrita associada a MLC) no presenten defecte en la formació d'homodímers però sí que afecten a la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars. Aquests estudis però, requereixen de més experiments per determinar exactament el defecte que causa la mutació.

DEFECTE	MUTACIÓ
NIVELLS EXPRESSIÓ PROTEICA	L23H, W263X (<i>Recessives</i>)
CIS-HOMOOLOGOMERITZACIÓ I TRÀFIC A UNIONS CEL·LULARS	R92Q, R98C (<i>Recessives</i>) G89D, G89S, R92W (<i>Dominants</i>)
TRÀFIC A UNIONS CEL·LULARS (sense defecte en <i>cis</i> -homooligomerització)	D128N, Q56P*, S59N* (<i>Dominant</i>)
TRÀFIC A LA MEMBRANA EN ASTRÒCITS Mlc1-/-	P148S (<i>Recessiva</i>)
INTERNALITZACIÓ EN ASTRÒCITS Mlc1-/- EN PRESENCIA D'ALT K ⁺	K135Del (<i>Dominant</i>) S196Y, D211N (<i>Recessives</i>)

Taula 10. Classificació de les diferents mutacions de *GLIALCAM* identificades en pacients MLC2A i MLC2B en funció del defecte que provoquen. Resultats preliminars de les mutacions marcades amb * mostren com aquestes mutacions presenten un defecte en el tràfic a unions cel·lulars sense afectar a la formació de dímers, però encara no s'han obtingut resultats conclouents.

2. ESTUDIS DE LA RELACIÓ ENTRE L'ESTRUCTURA I LA FUNCIÓ DE GlialCAM.

Tot i poder classificar les mutacions de *GLIALCAM* en funció del defecte que exhibien, no podíem entendre perquè cada mutació provocava un tipus de defecte específic, ja que no totes les mutacions recessives provocaven el mateix defecte així com tampoc les dominants. A més a més, tampoc podíem associar l'afectació de cap regió de la proteïna amb un tipus específic de defecte.

Per aquesta raó, ens vam plantejar aprofundir més en la relació existent entre l'estructura de GlialCAM i la seva funció. Per això, es van realitzar diferents aproximacions, per una banda es va intentar obtenir l'estructura tridimensional de la proteïna i per l'altra, es van realitzar experiments bioquímics per estudiar la interacció *trans*-homofílica de GlialCAM. Per últim, es va realitzar un model tridimensional per homologia de la interacció *cis*- i *trans*-homofílica de GlialCAM.

2.1. PROVES D'OBTENCIÓ DE L'ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE GlialCAM.

El grup es va plantejar avançar en l'estudi de l'estructura de GlialCAM mitjançant l'obtenció de la seva estructura tridimensional. Per a aconseguir l'estructura tridimensional per difracció de raigs X es necessiten grans quantitats de proteïna (de l'ordre de mg) d'una gran puresa i d'aquesta manera poder cristal·litzar-la. Així doncs,

la proteïna s'ha d'expressar en suficient quantitat i de manera soluble, s'ha de purificar i s'ha de cristal·litzar, procés que requereix molts passos d'optimització. Aquests experiments es van realitzar amb l'ajuda de la Dra. Joana Fort i el Dr. Manuel Palacín, del Parc Científic de Barcelona.

Atès que els mutants de *GLIALCAM* associats a MLC es localitzen en el domini extracel·lular i estudis previs havien aconseguit purificar aquest domini (Gaudry et al., 2008), es van construir dos plasmidis que expressessin únicament el domini extracel·lular. El primer plasmidi expressava tot el domini extracel·lular sencer (IgV+IgC2) i el segon plasmidi només expressava el domini IgV. Tots els plasmidis que es van clonar tenien un promotor induïble per IPTG (*isopropyl- β -thiogalactoside*). El plasmidi escollit per a l'expressió en bacteris va ser el pTrcHis (Invitrogen), caracteritzat per tenir una cua de sis histidines a l'extrem N-terminal, que ens seria útil a l'hora de purificar la proteïna a través de la columna de níquel.

2.1.1. Proves d'expressió en *E.Coli*.

Per tal d'obtenir la major quantitat possible de proteïna soluble, es va optimitzar diferents punts en l'expressió de la proteïna GlialCAM en un sistema procariota, l'*E.Coli*.

Primer de tot, es va posar a punt les condicions òptimes d'expressió proteica de GlialCAM. Es van fer proves en diferents soques deficientes per les proteases *Lon* i *OmpT* proporcionant així, estabilitat a la proteïna expressada. Les soques escollides van ser les BL21, BL21 *Star* i *Rosetta* i es van fer créixer a diferents temps d'inducció amb IPTG (3h, 5h i O/N) i a diferents temperatures (25°C i 37°C). Es va observar que la millor condició era treballar amb les BL21 *Star* en un període d'inducció de 5 hores a 37°C (dades no mostrades).

A continuació es va estudiar en quina fracció podíem trobar les nostres proteïnes recombinants. Després de la seva expressió en les BL21 *Star*, es va analitzar per mitjà de WB detectant la proteïna recombinant amb l'anticòs *HisProbe*, el qual reconeix la cua d'histidines del vector d'expressió. En ambdós casos es va observar que l'expressió de les dues proteïnes recombinants era suficient, però després de l'extracció de la proteïna soluble mitjançant la lisi amb *French Press* vam detectar la proteïna majoritàriament en la fase insoluble i cossos d'inclusió (pèl·let). Aquesta proporció era més accentuada en el cas de GlialCAM IgV+IgC2, on hi havia molt poca expressió en la fracció soluble (**Figura 41**). També es va observar que en el cas de la proteïna recombinant GlialCAM IgV+IgC2, l'anticòs contra les histidines de la cua N-

terminal reconeixia el fragment IgV, degut probablement a la auto proteòlisi d'aquest domini.

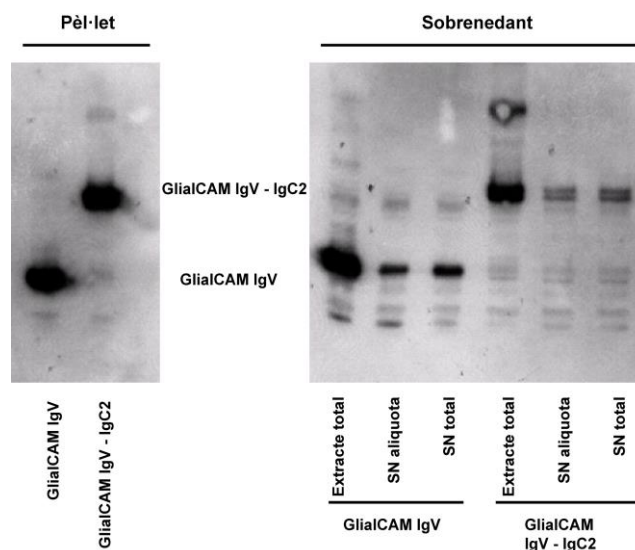


Figura 41. Nivells d'expressió i fracció en la qual es troben les proteïnes recombinants. Bacteris BL21 *Star* induïts 5h amb IPTG a 37°C van ser lissats i centrifugats per posteriorment ser analitzats per WB. Les mostres corresponen a quantitats proporcionals del sobrenedant i pèl·let de la mateixa centrifugació (SN total). SN alíquota correspon a una fracció del cultiu lissat i centrifugat a petita escala (1 ml) com a control de centrifugació.

2.1.2. Purificació de GlialCAM.

Aprofitant les histidines introduïdes en les proteïnes produïdes en *E.Coli* amb el plasmidi pTrcHis, la cromatografia escollida per purificar-les de l'extracte de proteïna soluble va ser la d'afinitat amb una columna de níquel. Es carrega la columna amb níquel, metall pel qual les histidines tenen molta afinitat i després de fer passar la mostra, s'elueix amb Imidazol, molècula que conté el grup funcional de la histidina i competeix amb els punts d'unió metàl·lics de la matriu, alliberant així la proteïna unida.

En l'anàlisi per WB de les mostres purificades amb la columna de níquel no es va incloure la mostra d'extracte total ni la del sobrenedant (GlialCAM soluble), així que tot i que s'observa que s'ha purificat GlialCAM no es pot saber si la purificació era suficient per seguir endavant amb el procés.

Així doncs, tenint en compte que GlialCAM es trobava majoritàriament en la fracció no soluble i cossos d'inclusió i que com a conseqüència d'aquesta baixa quantitat de proteïna en la fracció soluble, sembla obtenir-se una petita quantitat de proteïna recombinant purificada, vam decidir que aquesta quantitat no era suficient per a poder realitzar assaigs de cristal·lització de GlialCAM i per tant no vam poder obtenir cap informació estructural per mitjà d'aquesta tècnica.

2.2. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ EN TRANS DE GlialCAM EN CÈL·LULES HeLa.

A continuació, ens vam preguntar si la localització de GlialCAM a les unions cel·lulars depenia de la presència de la proteïna a la membrana plasmàtica de la cèl·lula adjacent.

Per a realitzar aquests estudis es va expressar GlialCAM en cèl·lules HeLa i es va analitzar si hi havia diferències en la seva localització quan aquest contacte cel·lular es donava entre cèl·lules on ambdues expressaven GlialCAM respecte quan només una de les cèl·lules en contacte l'expressava. Es va observar que per a que hi hagués una alta concentració de la proteïna a les regions de contacte era indispensable que les dues cèl·lules en contacte expressessin alhora GlialCAM (**Figura 42**). Aquests resultats suggereixen que pot existir la interacció *trans*-homofílica entre molècules de GlialCAM de dues cèl·lules diferents.

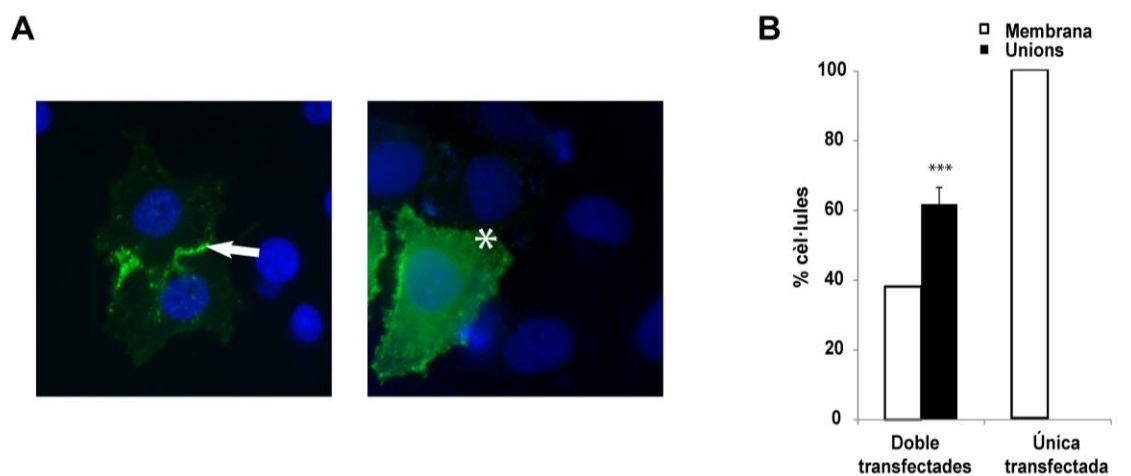


Figura 42 La localització de GlialCAM en regions de contacte entre cèl·lules depèn de la expressió de la proteïna en ambdues cèl·lules en contacte. Cèl·lules HeLa transfectades amb GlialCAM-Flag van ser fixades i permeabilitzades. **(A)** Posteriorment es va realitzar un assaig d'immunofluorescència amb l'anticòs monoclonal contra l'epítip Flag fusionat a GlialCAM (verd). Les fletxes assenyalen la regió d'unió i l'asterisc assenyalava la deslocalització de GlialCAM en les unions cel·lulars. **(B)** Quantificació del percentatge de cèl·lules on GlialCAM es concentrava en unions. Les dades corresponen a 2 experiments independents + SEM en un comptatge de 68 cèl·lules totals. S'ha utilitzat el test estadístic *t Student* no aparellat. *** $p < 0.001$

S'ha observat com en altres proteïnes amb una estructura similar a GlialCAM com poden ser les CD84, les interaccions *trans*-homofíliques entre el domini extracel·lular són necessàries per a la correcta localització en contactes cel·lulars (Yan et al., 2007). Per estudiar si existia aquestes interaccions *trans* en el domini extracel·lular de GlialCAM, es va afegir un epítip HA abans del domini IgV i es va observar com la localització en unions d'aquesta proteïna es veia dràsticament reduïda (**Figura 43 A, B**). Tot i així, aquest defecte no es deu a una reducció en l'habilitat d'interaccionar en *cis* tal i com es va observar mitjançant la tècnica de *split*-TEV on fins i tot mostrava una

millora significativa en l'homooligomerització (**Figura 43 C**). Aquests resultats suggereixen que interferint estèricament les interaccions *trans*-homofíliques del domini extracel·lular, es redueix la localització en unions independentment de la correcta interaccions en *cis*.

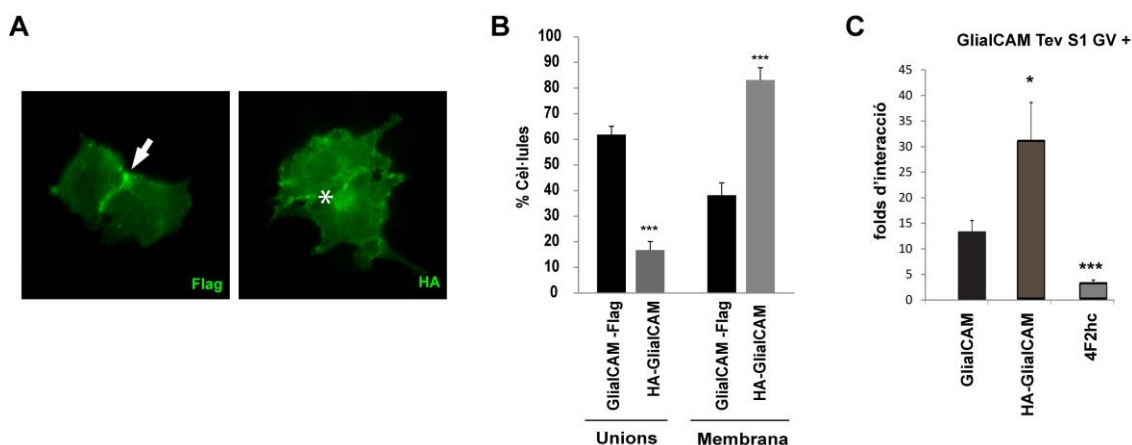


Figura 43. L'addició d'un epítot a l'extrem N-terminal de GlialCAM impedeix la concentració de la proteïna en les regions d'unió, però afavoreix la interacció *cis*-homofílica. **(A)** Cèl·lules HeLa transfectedes amb la proteïna GlialCAM-Flag o HA-GlialCAM van ser fixades i permeabilitzades per realitzar posteriorment un assaig d'immunofluorescència amb un anticòs monoclonal contra l'epítot Flag o un anticòs monoclonal contra l'epítot HA fusionats a GlialCAM. Les imatges van ser adquirides en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus*. Les fletxes indiquen els contactes cèl·lula-cèl·lula i l'asterisc l'absència de colocalització. **(B)** Parelles de cèl·lules van ser analitzades manualment i quantificades segons si la proteïna es concentrava en unions o es localitzava repartida per tota la membrana plasmàtica (s'empra el programa *Image J* per realitzar el *intensity profile* i discernir entre les localitzacions esmentades). Dades corresponents a 4 experiments independents + SEM (GlialCAM-Flag, 138 cèl·lules; HA-GlialCAM, 196 cèl·lules). *** $p < 0.001$, *t Student* no aparellat. **(C)** Cèl·lules HeLa es van cotransfectar amb les construccions corresponents i la interacció es va monitoritzar per l'assaig de *split-TEV*. Dades representades en *folds* d'interacció i corresponents a 6 experiments independents + SEM. 4F2hc s'utilitza com a control negatiu de l'experiment. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, *t Student* no aparellat.

2.2.1. Anàlisi de la interacció *trans* de GlialCAM per mitjà d'assaigs de *mixing cells*.

Com s'ha explicat anteriorment, estudis de dominància de les mutacions de GlialCAM mostren que la proteïna *wild-type* és capaç de recuperar el defecte de tràfic de MLC1 que causaven les mutacions recessives però no recuperava la deslocalització de MLC1 causada per les mutacions dominants (López-Hernández et al., 2011b).

En aquest context vam voler estudiar si la capacitat de GlialCAM per a recuperar el defecte de tràfic homointeraccionant en *cis* també era possible observar-ho en *trans*, és a dir volíem estudiar si la proteïna GlialCAM correctament localitzada a la membrana d'una cèl·lula era capaç de recuperar el defecte provocat per una proteïna defectiva en la cèl·lula adjacent.

Per a realitzar aquest experiment primer de tot vam generar un plasmidi que ens permetés expressar conjuntament GlialCAM i MLC1 (constructe generat pel meu company de laboratori Héctor Gaitán) i així assegurar-nos que en detectar MLC1 en unions, aquesta estaria colocalitzant amb GlialCAM. Els mutants defectius escollits van ser el mutant dominant R92W i el mutant recessiu R92Q, ja que era interessant que un mateix residu portés dues mutacions diferents, una dominant i una recessiva, i que només una de les mutacions fos recuperada per la proteïna *wild-type*, la mutació recessiva R92Q.

Per a dur a terme aquest experiment, es van transfectar independentment el plasmidi GlialCAM-MLC1 i el plasmidi GlialCAM-Flag *wild-type* o els mutants R92Q-Flag i R92W-Flag. Passades 24 hores, es van tripsinitzar les cèl·lules i barrejar en proporcions iguals les cèl·lules que contenien el plasmidi GlialCAM-MLC1 amb les que contenien el plasmidi GlialCAM *wild-type* o mutants. A les 24 hores es va realitzar l'assaig d'immunofluorescència detectant MLC1 humana i l'epítot Flag fusionat a GlialCAM, per així poder detectar només la proteïna de GlialCAM *wild-type* o mutant present en les cèl·lules, la qual no s'havia expressat amb MLC1.

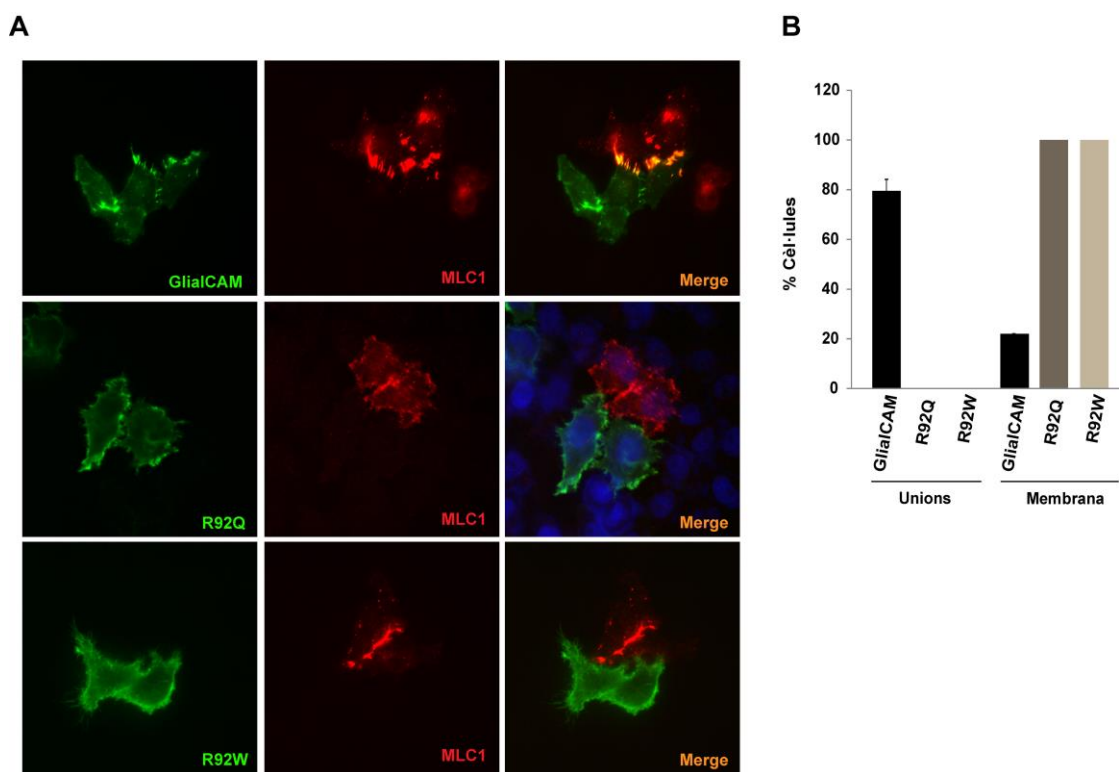


Figura 44. GlialCAM no és capaç de recuperar el defecte de tràfic de MLC en *trans*. (A) Cèl·lules HeLa transfectades independentment amb els constructes corresponents i barrejades en igualtat de proporcions van ser fixades, permeabilitzades i es van realitzar assaigs d'immunofluorescència amb l'anticòs policlonal contra MLC1 humana (vermell) i l'anticòs monoclonal contra l'epítot Flag fusionat a GlialCAM (verd). En groc (merge) es mostra la col·localització de les proteïnes. (B) Quantificació de la localització de GlialCAM en unions cel·lulars. Dades corresponents a 4 experiments independents: GlialCAM n=116 cèl·lules, R92Q n=24, R92W n=11).

Es va observar que GlialCAM *wild-type* era capaç de colocalitzar amb MLC1 de la cèl·lula adjacent suggerint una interacció en *trans* entre aquestes dues proteïnes i conseqüentment entre les dues proteïnes de GlialCAM. Demostrant que, per a que GlialCAM dirigeixi el tràfic de MLC1 a les unions, és indispensable i suficient que les dues cèl·lules adjacents expressin GlialCAM. En els casos dels mutants R92Q i R92W, no va ser possible trobar cap cèl·lula on GlialCAM colocalitzés amb la proteïna MLC1 de la cèl·lula adjacent (**Figura 44**). Aquests estudis demostren que per a que GlialCAM pugui recuperar el defecte de la proteïna mutada de la cèl·lula adjacent és indispensable que hi hagi una correcta interacció en *cis* dintre de la mateixa cèl·lula.

Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts en experiments realitzats en paral·lel en col·laboració amb el Dr. Thomas Jentsch on es va estudiar la interacció *trans* de GlialCAM i MLC1 o CIC-2 en cèl·lules HeLa. El resultat mostraven que és indispensable que les dues cèl·lules en contacte expressessin GlialCAM per a localitzar MLC1 i CIC-2 en les regions de contacte cèl·lula-cèl·lula, però que aquesta localització de MLC1 i CIC-2 no depèn que les dues cèl·lules adjacents expressin alhora la proteïna. Només és necessari que una de les cèl·lules adjacents l'expressi per a que la interacció en *cis* de GlialCAM amb MLC1 o CIC-2 sigui capaç de modificar el seu tràfic dirigint-la a les unions cel·lulars (Hoegg-Beiler et al., 2014).

En aquests experiments també vam observar que les cèl·lules que expressaven les proteïnes mutades les trobàvem majoritàriament en un pla focal diferent a les cèl·lules que expressaven MLC1 i GlialCAM *wild-type*, més acusadament en el cas del mutant R92W. Per intentar millorar aquest possible defecte d'adhesió vam pre-tractar els cubres on es plantarien les cèl·lules amb poli-lisina i així afavorir que totes les cèl·lules transfectades es trobessin en el mateix pla, però aquest tractament no va millorar els resultats de l'experiment (dades no mostrades). Aquest fet ens va fer qüestionar si aquests mutants podrien provocar un defecte d'adhesió cel·lular.

2.3. OBTENCIÓ D'UN MODEL TRIDIMENSIONAL PER HOMOLOGIA DE GlialCAM.

S'ha predit que GlialCAM presenta un domini extracel·lular, format per un domini IgV i un domini IgC2 (dominis de tipus Ig-like), un segment transmembrana i una cua citoplasmàtica (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005).

S'ha descrit també, que la proteïna GlialCAM és capaç d'interaccionar en *cis* (López-Hernández et al., 2011a; Moh et al., 2005) i que es localitza en la membrana cel·lular concentrada a les unions cel·lulars en condicions d'alta confluència (López-Hernández et al., 2011b). Estudis realitzats amb les proteïnes JAM, proteïnes de la família de les

IgCAMS d'estructura similar a GlialCAM, mostren que la formació d'homodímers en *cis* és estrictament necessari per la interacció en *trans* de la proteïna (Ebnet et al., 2003; Mandell et al., 2005).

Estudis previs realitzats pel Dr. Xavier Capdevila han identificat el domini citoplasmàtic com el responsable per a la correcta localització de la proteïna en les unions cel·lulars; localització que requereix que la proteïna presenti un estat d'oligomerització. Per tant, el domini extracel·lular també és necessari per a crear les condicions necessàries d'oligomerització per a què la proteïna es pugui localitzar a les unions cel·lulars. Per altra banda, s'ha identificat el domini extracel·lular com el domini indispensable per la correcta expressió de la proteïna i és el responsable de la *cis*-homodimerització de GlialCAM, recaient la major importància en el domini IgV (dades no publicades). Finalment, estudis funcionals han identificat el segment transmembrana, específicament els aminoàcids localitzats a l'inici del domini transmembrana, com el domini responsable dels canvis en les propietat funcionals del canal CIC-2, tant d'activació com de rectificació, activant CIC-2 mitjançant l'obertura del *common gate* (Jeworutzki et al., 2012).

Atès que no es va poder obtenir cap informació de l'estructura tridimensional de GlialCAM mitjançant la seva cristal·lització, ens va fer considerar altres opcions com la de realitzar un model per homologia de la seva estructura i de la interacció entre molècules de GlialCAM. Aquest model es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Juan Fernández-Recio del Barcelona Computing Center (BSC).

Es van generar els diferents models del monòmer de GlialCAM extracel·lular amb els programes bioinformàtics HHPred, DomTHREAD i pGENTHREAD, utilitzant diferents models de proteïnes *template* (1NEU, 4GOS, 3JZ7, etc) i posteriorment, es va realitzar la reconstrucció del dímer en base al *template* 3JZ7 (CAR), 3R0N (Nectin-2) o 3PKD (CD84). De tots els models obtinguts, el model més favorable era el que s'havia generat per mitjà del programa HHPred per al monòmer de GlialCAM utilitzant el *template* de 3JZ7 (CAR) així com la reconstrucció més adient del dímer ha sigut la generada amb el *template* de l'homodímer de 3JZ7.

Gràcies a aquest model per homologia, es va observar que la formació del complex dimèric tenia lloc entre els dominis IgV localitzats a la membrana de la mateixa cèl·lula (**Figura 45 A**). En canvi, la formació tetramèrica entre dues cèl·lules en contacte no es dona entre tots els monòmers dels dímers sinó que la interacció entre molècules de GlialCAM oposades només té lloc per un dels monòmers de cada dímer (**Figura 45 B**).

Per altra banda, per a aprofundir en la relació de cada mutació en *GLIALCAM* amb el defecte que provoca la proteïna resultant es va voler estudiar la localització dels residus mutats en el model estructural per homologia. El primer que es va observar en aquest model va ser que les mutacions que afecten a la interacció en *cis* de GlialCAM afecten a una interfície de la proteïna diferent que les mutacions que afecten la interacció en *trans* (**Figura 45**). Si ens fixem en els residus destacats en el dímer de la interacció *cis*, aquests es troben localitzats en la cara exterior esquerra del domini IgV (**Figura 45 A**), en canvi, els residus que afecten la interacció *trans* es localitzen en la cara superior dreta del domini IgV, encarant així la molècula de GlialCAM oposada de la cèl·lula en contacte (**Figura 45 B**). Segurament la interacció *cis* sigui necessària per a poder estabilitzar el complex dimèric, per això, pot ser que aquelles mutacions que presenten un defecte de *cis*-oligomerització, com les mutacions G89S/D, R92Q/W i R98C, al no formar correctament el dímer presentin també un defecte en la interacció *trans* i per tant, un defecte en el tràfic cel·lular. En canvi, les mutacions Q56P, S59N i D128N, al estar en una cara diferent de la proteïna, no afectarien a la formació del complex dimèric, ja que mostren uns nivells de *cis*-oligomerització similars a la proteïna *wild-type* però quan es forma el complex tetramèric aquestes mutacions alteren la interacció *trans* amb la molècula GlialCAM de la cèl·lula adjacent i per tant no es concentraria en les regions d'unió cel·lular.

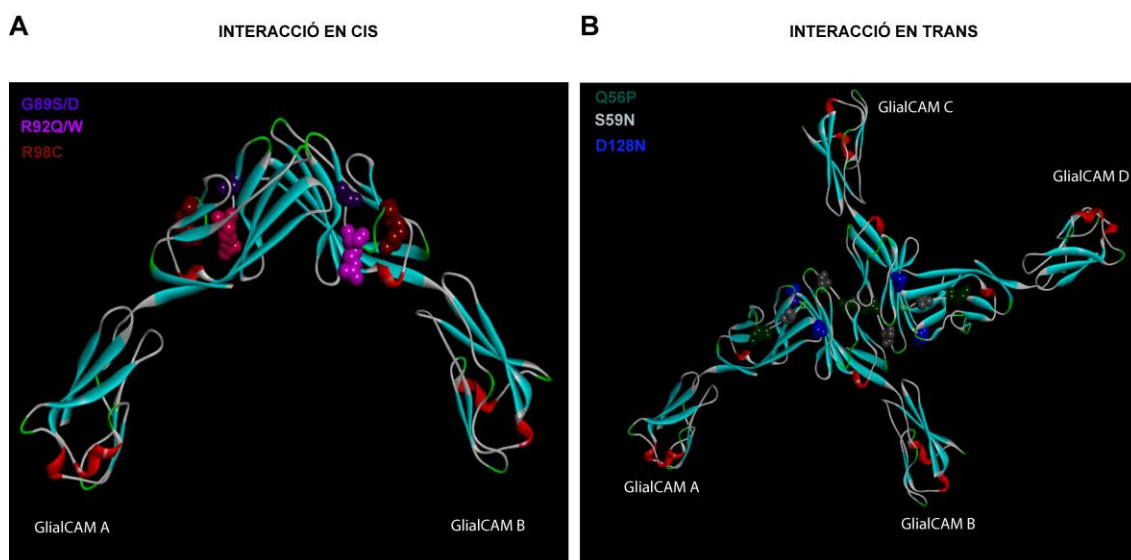


Figura 45. Model virtual del complex dimèric i tetramèric de GlialCAM. (A) Model virtual de la interacció en *cis* (formació dimèrica) entre molècules de GlialCAM. **(B)** Model virtual de la interacció en *trans* (formació tetramèrica) entre molècules de GlialCAM de cèl·lules en contacte. S'ha utilitzat el programa *Discovery Studio 4.0* per a visualitzar la formació de complexos de GlialCAM predites.

En el cas de la mutació recessiva P148S, es va observar localitzada en la cara exterior

del domini IgC2 (**Figura 46 A**). Una possibilitat sigui que en aquesta regió específica on es troba la mutació es produeixi la interacció amb MLC1 i per tant, quan no hi és present MLC1 en la cèl·lula la molècula defectiva de GlialCAM es torna inestable i s'internalitza.

Per altra banda, les mutacions S196Y i D211N es localitzen també en el domini IgC2 però en una zona encarada cap a la membrana i cap a l'interior del complex dimèric. La mutació K135Del es localitza en el domini IgV, però a diferència de les mutacions que afecten a la interacció *trans*, tot i trobar-se en la mateixa cara del monòmer, no es localitza en la cara superior de la molècula i probablement per això no alteraria la interacció *trans* (**Figura 46 B**). D'aquesta manera, aquestes tres mutacions no afectarien a la interacció en *cis* ni en *trans* entre molècules de GlialCAM però sí que afectarien a la seva interacció amb MLC1, dotant a GlialCAM d'una estabilitat a la membrana independent de la presència de MLC1 i per això, sota condicions d'hiperactivitat neuronal, la manca de MLC1 no provocaria la seva inestabilitat a la membrana i la conseqüent internalització de la proteïna.

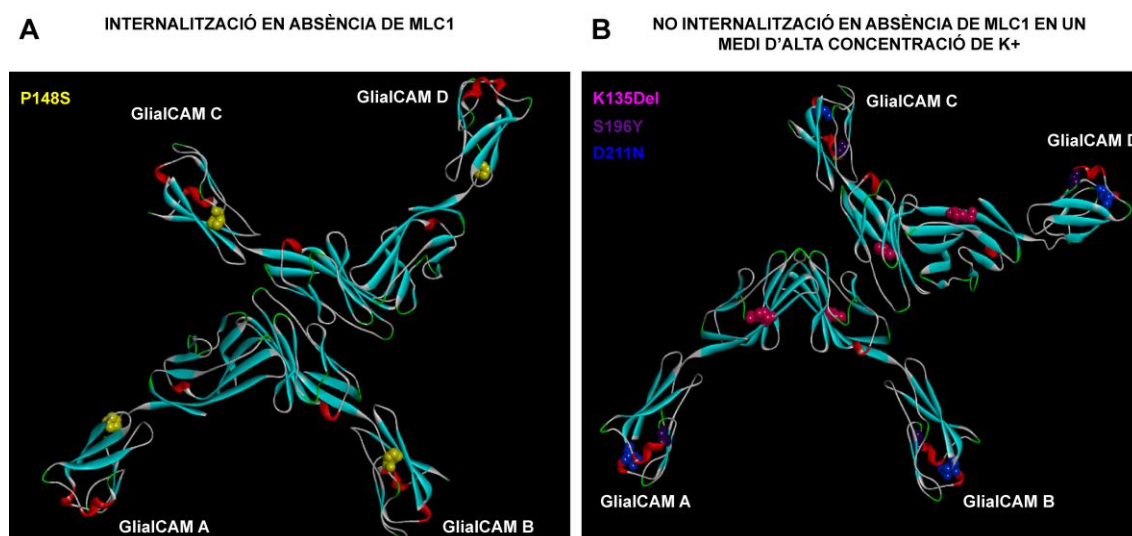


Figura 46. Localització de les mutacions defectives en absència de MLC1 en el model per homologia del complex tetramèric de GlialCAM. (A) Model de la localització del residu P148S (formació tetramèrica). **(B)** Model dels residus K135Del, S196Y i D211N (formació tetramèrica). S'ha utilitzat el programa *Discovery Studio 4.0* per a visualitzar la formació de complexos de GlialCAM predites.

S'ha observat que hi ha diferents residus altament conservats entre els diferents models i *templates*, com per exemple el residu R98. En base al model obtingut s'ha observat un parell de possibles interaccions intermoleculars interessants per a realitzar estudis de *cross-linking*: R64-E86 (distància CA-CA entre 6.6 i 8.1 Å) i D129-R92 (distància entre 8.1 i 9.0 Å). La distància CA-CA entre *cis* formant ponts disulfur normalment es

troba entre 5.5 i 7.0 Å, així que el primer grup encaixaria a la perfecció, mentre que l'altre grup d'interacció potser no encaixaria del tot.

Actualment, gràcies a les dues superfícies d'interacció predites mitjançant el model per homologia (interacció *cis* i *trans*) s'estan duent a terme nous experiments per avançar en la relació estructura-funció de GlialCAM, així com també avançar en la formació de l'heterocomplex GlialCAM-MLC1 i GlialCAM-CIC-2.

CAPÍTOL 2.

Paper de GlialCAM en la biogènesi de CIC-2

S'ha descrit que ratolins *knock-out* per *CLCN2* a part de presentar ceguesa i esterilitat, presenten vacuolització en la substància blanca similar a la que presenten els pacients de MLC (Blanz et al., 2007). Tot i així, no s'ha trobat cap pacient afectats per la MLC que presenti mutacions en *CLCN2* (Blanz et al., 2007; Scheper et al., 2010) i tampoc s'ha observat una interacció directe entre les proteïnes CIC-2 i MLC1 (Duarri et al., 2011). S'ha identificat però, que el segon gen de malaltia, *GLIALCAM*, actua com a subunitat auxiliar de CIC-2, capaç de dirigir el seu tràfic a les unions cel·lulars i modificar les propietats funcionals del canal (Jeworutzki et al., 2012). Recentment, s'ha implicat aquest canal en la patogènesis de MLC a través de l'alteració del flux d'ions en oligodendròcits (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Per altra banda, un estudi realitzat en diferents pacients afectats per leucoencefalopaties amb edema intramielínic (LKPAT) [MIM #615651] ha permès identificar diverses mutacions en *CLCN2* (Depienne et al., 2013). Aquestes mutacions presentaven una dràstica o completa reducció en la seva funcionalitat per diferents mecanismes, per exemple mitjançant una reducció en l'arribada a la membrana cel·lular a causa de la seva degradació en el reticle endoplasmàtic o per una disminució en l'expressió del mRNA que conté la mutació.

Donat que resultats previs del grup mostren que GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1 millorant l'estabilitat proteica, l'expressió en superfície de les variants mutades de MLC1 associades a MLC, reactivant les corrents VRAC i revertint la vacuolització causada per les variants mutades de MLC1 (Capdevila-Nortes et al., 2013), en aquest capítol es va voler estudiar el paper de GlialCAM en la biogènesi de CIC-2. Per a realitzar aquest estudi es va analitzar el defecte de funció que presentaven les mutacions en *CLCN2* i si GlialCAM era capaç de millorar bioquímica i funcionalment les variants de CIC-2 associades a leucoencefalopaties amb edema intramielínic.

1. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DELS MUTANTS DE CIC-2 ASSOCIATS A LEUCOENCEFALOPATIES AMB EDEMA INTRAMIELÍNIC.

De totes les mutacions en *CLCN2* associades a leucoencefalopaties amb edema intramielínic, es van escollir dues per al seu estudi, la deleció Leu144_Ile145Del i la mutació Ala500Val. Es creu que aquestes mutacions afecten a aminoàcids hidrofòbics conservats localitzats en els dominis transmembrana de CIC-2, provocant segurament un mal plegament o una mala inserció de la proteïna en la membrana.

Així doncs, es va voler estudiar el defecte funcional que presentaven les proteïnes mutades i analitzar quin efecte tenia la presència de GlialCAM. Amb aquesta finalitat, es va realitzar un estudi funcional dels mutants de CIC-2 en presència o absència de GlialCAM mitjançant assaigs de *Voltage-clamp* en oòcits de *Xenopus* i de *Patch-clamp* en cèl·lules HEK.

Primer de tot, el meu company Héctor Gaitán va analitzar la funcionalitat del canal en oòcits de *Xenopus* per mitjà d'estudis d'electrofisiologia. Els resultats van mostrar que els mutants Leu144_Ile145Del i Ala500Val no presentaven activitat del canal CIC-2 (**Figura 47**).

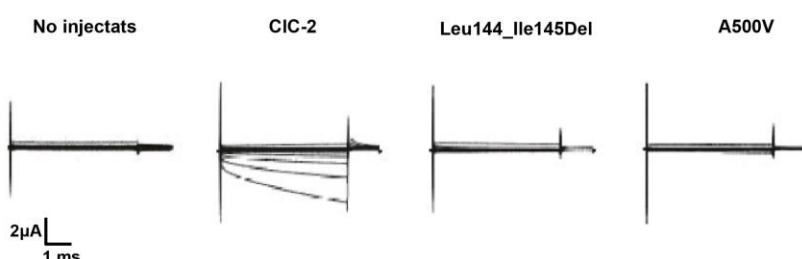


Figura 47. L'activitat de canal CIC-2 es perd en els mutants associats a LKPAT en oòcits de *Xenopus*. Es van injectar els diferents constructes en oòcits de *Xenopus* i mitjançant la tècnica de *Voltage-clamp* es van mesurar les corrents regulades per CIC-2. Es mostra un exemple representatiu de les traces del canal.

A continuació, ens vam qüestionar si GlialCAM era capaç de recuperar la funcionalitat d'aquests mutants. Al coexpressar GlialCAM amb els mutants defectius de CIC-2, es va observar que en el cas del mutant Leu144_Ile145Del, la presència de GlialCAM no produïa cap canvi, però sí que augmentava les corrents regulades per CIC-2 del mutant A500V (**Figura 48 A**), tot i que en una menor amplitud que la observada en la proteïna *wild-type* (**Figura 48 B**).

Es va analitzar la sensibilitat del canal a canvis de pH i es va observar que GlialCAM conservava la capacitat d'activar el canal per mitjà de l'obertura del *common gating* del mutant A500V de CIC-2, reduint la inhibició del canal a pH àcids (**Figura 48 C**). No es va poder realitzar aquest experiment en oòcits que expressaven només el mutant A500V ja que l'amplitud de les corrents eren massa petites per poder observar qualsevol canvi.

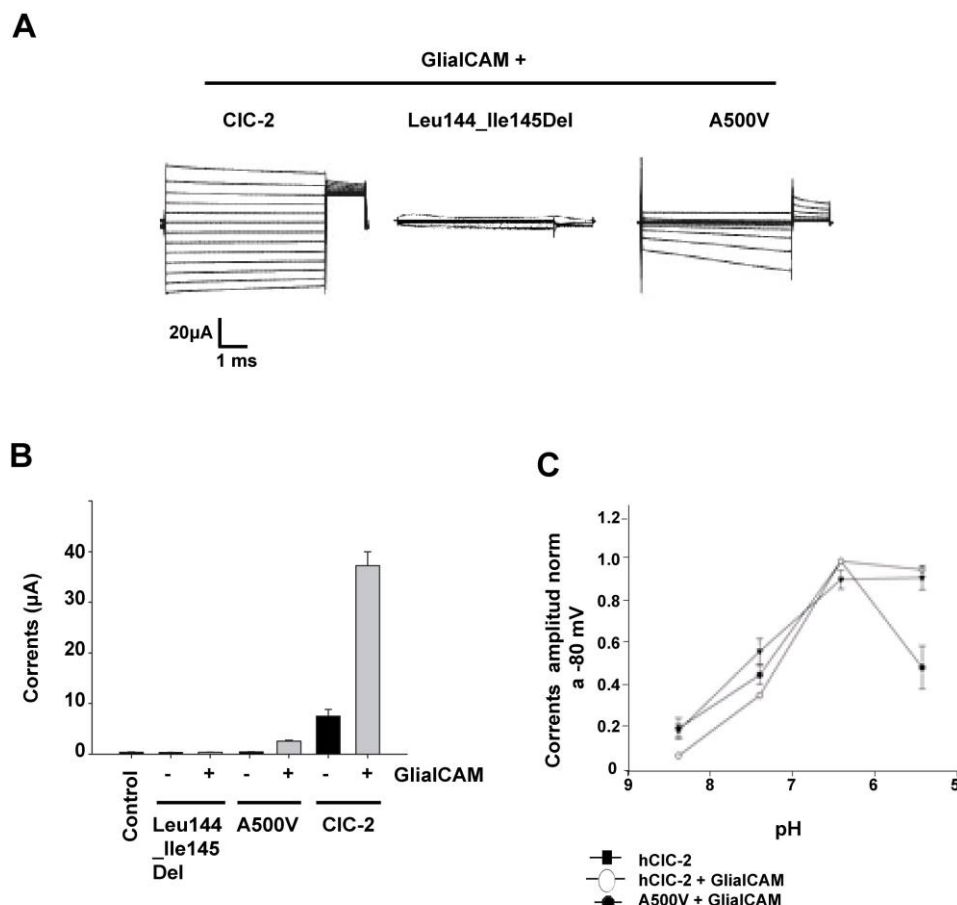


Figura 48. GlialCAM incrementa les corrents i modifica les propietats d'activació del mutant A500V de CIC-2 associat a LKPAT en oòcits de *Xenopus*. (A) Corrents regulades per CIC-2 en oòcits al coexpressar GlialCAM amb CIC-2 *wild-type* o les variants mutades. (B) Quantificació de les corrents de CIC-2 al expressar CIC-2 *wild-type* o les variants defectives i al coexpressar-les amb GlialCAM. (C) Sensibilitat del canal a pH, a voltatges negatius (-80mV).

L'ús d'un sistema heteròleg com els oòcits de *Xenopus* ens proporciona un model útil per a estudiar l'expressió i caracterització electrofisiològica del funcionament dels canals iònics cel·lulars (Bossi et al., 2007), tot i així es va voler validar aquests resultats en un sistema més proper al real, com les cèl·lules HEK i intentar així analitzar la modificació que GlialCAM provocava en l'activitat del canal del mutant A500V.

En col·laboració amb el Dr. Xavier Gasull, professor titular de la Universitat de Barcelona, es van realitzar estudis de *Patch-clamp* en cèl·lules HEK que expressaven la proteïna *wild-type* i el mutant A500V en presència o absència de GlialCAM. Es va observar que a diferència dels resultats obtinguts en oòcits, en les cèl·lules HEK el mutant A500V *per se* presentava una petita activitat (dades no mostrades). Quan es va coexpressar el mutant A500V amb GlialCAM, es va observar com GlialCAM era capaç d'incrementar les corrents regulades per CIC-2 i modificar les propietats d'activació del

canal en el mutant de CIC-2 de manera similar a la proteïna *wild-type* (dades no mostrades). La coexpressió de GlialCAM amb el mutant A500V provocava una major modificació de la rectificació del canal.

Així doncs, els mutants de CIC-2 estudiats Leu144_Ile145Del i A500V, presenten un defecte en la funcionalitat del canal i GlialCAM és capaç d'augmentar i modificar l'activitat i el *common gating* del mutant A500V.

2. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DELS MUTANTS DE CIC-2 ASSOCIATS A LEUCOENCEFALOPATIES AMB EDEMA INTRAMIELÍNIC.

2.1. EFECTE DE LES MUTACIONS EN CLCN2 EN LA CAPACITAT D'HETEROOLIGOMERITZAR AMB GlialCAM.

A partir dels resultats obtinguts mitjançant diferents assaigs de coimmunoprecipitació i *split*-TEV, s'ha descrit que GlialCAM interacciona directament amb CIC-2 actuant com a subunitat auxiliar (Jeworutzki et al., 2012). Així doncs, primer de tot es va estudiar si els mutants de CIC-2 mantenen la capacitat per heterooligomeritzar amb GlialCAM. Els resultats obtinguts en l'assaig *split*-TEV mostren que el mutant A500V és capaç d'interaccionar amb GlialCAM, mentre que el mutant Leu144_Ile145Del no presenta interacció amb GlialCAM en comparació amb l'antigen de superfície 4F2hc, proteïna de topologia semblant a GlialCAM amb un pas transmembrana emprat com a control negatiu (**Figura 49**).

Donat que els nivells proteics del mutant A500V són significativament menors que la proteïna *wild-type* (**Figura 50**) a partir d'aquests experiments només podem concloure que el mutant A500V manté la capacitat d'interaccionar amb GlialCAM però no podem determinar si aquesta interacció es veu afectada per la mutació.

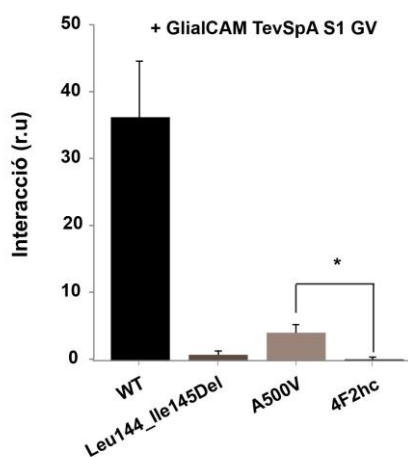


Figura 49. La mutació dominant A500V no afecta a la capacitat d'heterooligomeritzar amb GlialCAM. (A) Cèl·lules HeLa es van cotransfectar amb les construccions corresponents i la interacció es va monitoritzar per l'assaig de *split*-TEV. La senyal obtinguda es representa en *fold*s d'interacció respecte la senyal d'autoproteòlisi del factor de transcripció del constructe CIC-2. S'utilitza 4F2hc com a control negatiu. Dades corresponents a 3 experiments independents.

2.2. EFECTE DE LES MUTACIONS EN *CLCN2* EN EL TRÀFIC SUBCEL·LULAR DE LA PROTEÏNA CIC-2.

2.2.1. Efecte de les mutacions en *CLCN2* en els nivells proteics de CIC-2.

Tenint en compte que GlialCAM provocava una millora en la funció del canal del mutant A500V i que aquest mantenia la capacitat d'interaccionar amb GlialCAM, ens vam qüestionar també si GlialCAM era capaç de millorar bioquímicament els mutants defectius de CIC-2.

Primer de tot es va voler analitzar els nivells d'expressió proteica dels mutants de CIC-2, Leu144_Ile145Del i A500V. Un cop avaluats per mitjà de la tècnica de WB, es va observar una dràstica reducció dels nivells proteics d'ambdós mutants respecte la proteïna *wild-type*. Aquests resultats concordaven amb els resultats prèviament obtinguts en el treball de la Dra. Depienne. La coexpressió de GlialCAM amb els mutants de CIC-2 no va recuperar els nivells d'expressió proteica de cap dels mutants (Figura 50).

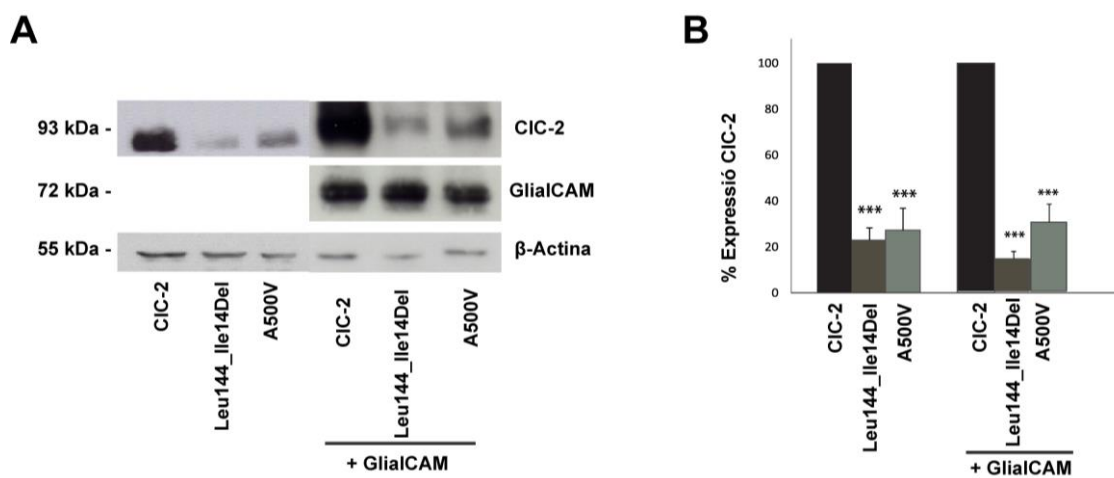


Figura 50. Estudi dels nivells d'expressió proteica dels mutants de CIC-2 associats a leucoencefalopaties. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb CIC-2-HA *wild-type* o els mutants defectius en absència o presència de GlialCAM. **(A)** 48 hores després es van realitzar extractes proteics que es van analitzar posteriorment per WB. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. **(B)** Quantificació dels nivells proteics obtinguts per WB. Dades corresponents a 4-6 experiments independents. Es va fer servir el test estadístic *t Student* no aparellat. *** $p < 0,001$

Resultats previs del grup van mostrar com GlialCAM millorava l'estabilitat proteica d'un mutant de MLC1 (López-Hernández et al., 2011b). Així doncs, el següent punt a estudiar va ser l'efecte que tenien les mutacions en CIC-2 sobre l'estabilitat de la proteïna i si GlialCAM hi exercia algun efecte positiu.

Per a realitzar aquest experiment es va utilitzar un inhibidor de la síntesi proteica, la cicloheximida (CHX). L'experiment es va realitzar en cèl·lules HEK transfectades amb CIC-2 *wild-type* o amb els dos mutants defectius, en presència i absència de GlialCAM i van ser incubades durant 1, 3 i 6 hores amb CHX a 37°C. El temps 0 correspon al grup de cèl·lules que no van ser tractades (**Figura 51**).

Es va observar una dràstica reducció de l'expressió proteica de les proteïnes defectives a mesura que augmentava el temps d'incubació amb CHX, essent quasi nul·la a les 6 hores de tractament en el cas de la mutació Leu144_Ile145Del, indicant així que les mutacions aportaven gran inestabilitat a la proteïna. En el cas de la proteïna *wild-type* no es va observar cap reducció significativa en la seva estabilitat durant tot el tractament amb CHX (**Figura 51 A**). Es va observar també, que la coexpressió de GlialCAM amb CIC-2 no semblava exercir una millora significativa en els nivells de proteïna dels mutants de CIC-2 (**Figura 51 B**).

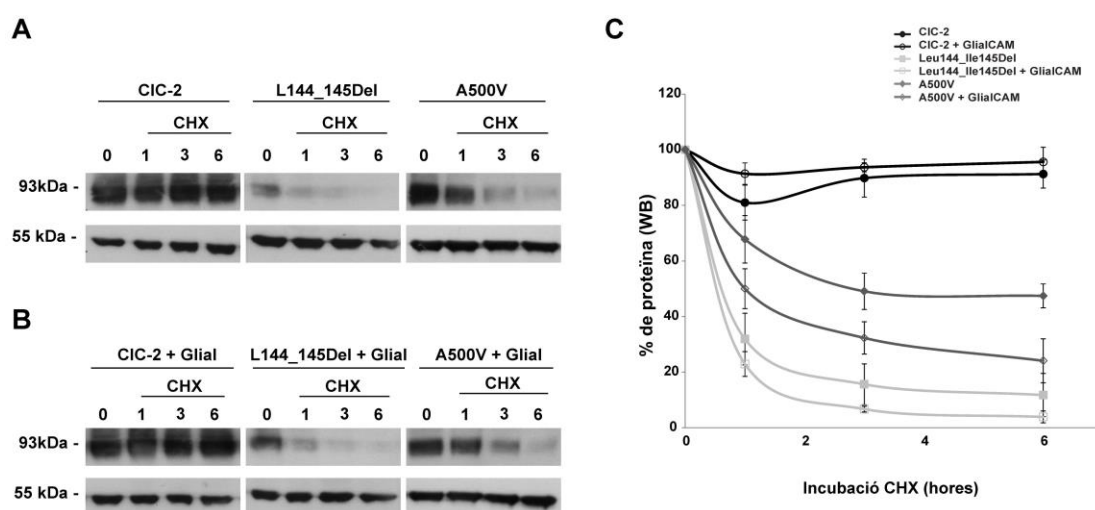


Figura 51. Estudi de l'estabilitat dels mutants defectius de CIC-2. (A) Estudi de l'expressió mitjançant WB de hCIC-2-HA *wild-type* i els mutants Leu144_Ile145Del i A500V. (B) Estudi de l'expressió mitjançant WB de hCIC-2-HA *wild-type* i els mutants Leu144_Ile145Del i A500V cotransfectades amb GlialCAM i tractades durant 6 hores amb CHX (100µg/ml). Es detecta hCIC-2-HA utilitzant l'anticòs monoclonal contra l'epítip HA. S'utilitza β-actina com a control de càrrega (55 kDa). (C) Quantificació del percentatge de proteïna hCIC-2 transfectada i cotransfectada amb GlialCAM. Dades corresponents a 6 experiments independents. S'ha utilitzat el test estadístic *t Student* amb resultat no significatiu per a cada condició.

Es van quantificar aleshores els nivells proteics obtinguts per WB dels mutants defectius amb i sense GlialCAM per tal d'analitzar si GlialCAM era capaç de millorar l'estabilitat. Es va observar que l'estabilitat de la proteïna hCIC-2 *wild-type* es mantenia inalterable durant tot el tractament tant en presència com en absència de GlialCAM. En canvi, els nivells d'expressió de les proteïnes mutades es veien disminuïts fins el 4%

en el cas de la mutació Leu144_Ile145Del i fins el 25% en la mutació A500V, essent a la primera hora de tractament amb CHX la reducció més dràstica. Quan aquests mutants es van coexpressar amb GlialCAM es va observar un augment dels nivells totals de proteïna fins el 12% en el cas del mutant Leu144_Ile145Del i fins el 47% en el mutant A500V. Tot i així els resultats obtinguts no eren significatius i per tant, podem concloure que GlialCAM no millora l'estabilitat proteica dels mutants defectius de CIC-2 (Figura 51 C).

2.2.2. Efecte de les mutacions en *CLCN2* en el tràfic de CIC-2 a la membrana.

A continuació es va voler analitzar si els nivells de CIC-2 a la membrana plasmàtica es veien afectats per les variants portadores de mutacions. En col·laboració amb el Dr. Gergely Luckacs, professor de la Universitat McGill de Quebec, es van realitzar diferents estudis per detectar els nivells proteics a la membrana plasmàtica i de reciclatge proteic.

Es van realitzar assaigs de luminescència ELISA per a detectar la proteïna CIC-2 en la superfície de la membrana plasmàtica de cèl·lules HeLa quan s'expressava amb o sense GlialCAM. En primera instància, es va observar com les proteïnes defectives presentaven una menor localització a la membrana plasmàtica de la cèl·lula en comparació amb la proteïna *wild-type*. També es va poder observar com la presència de GlialCAM provocava una millora significativa de la quantitat de proteïna CIC-2 detectada en la membrana tant en la proteïna *wild-type* com en ambdues proteïnes mutades (Figura 52).

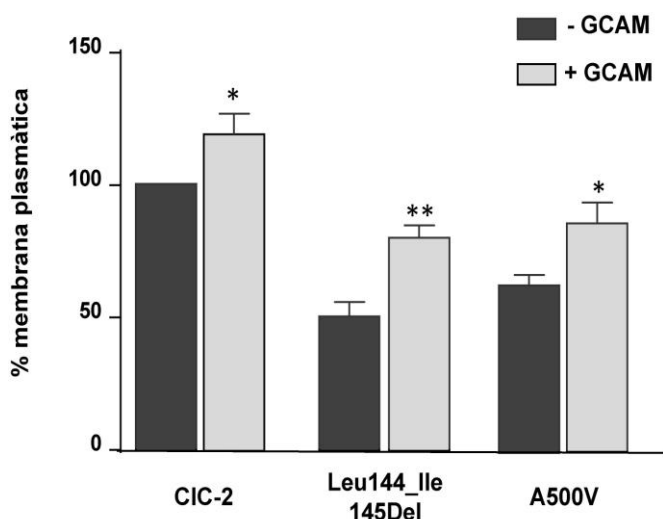


Figura 52. GlialCAM augmenta els nivells de CIC-2 en la superfície de la membrana plasmàtica. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els constructes corresponents i es van detectar els nivells de CIC-2 a la membrana plasmàtica mitjançant un assaig de luminescència ELISA utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítip HA dels constructes de CIC-2. Dades corresponents a 6 experiments independents, cada condició per triplicat. Test *t-student* realitzat, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

A partir dels resultats anteriors ens vam preguntar si aquesta millora dels nivells de CIC-2 en la membrana cel·lular era deguda a que la presència de GlialCAM millorava la sortida de CIC-2 del reticle endoplasmàtic o si per contra, aquesta millora venia

donada per una reducció en el procés d'endocitosis de *CLCN2*, un augment en la seva taxa de reciclatge o una reducció de la seva degradació lisosomal.

Primer de tot, vam voler estudiar si les mutacions en CIC-2 afectaven al seu tràfic cel·lular i si GlialCAM millorava la presència de CIC-2 a la membrana modificant directament la seva sortida del reticle endoplasmàtic. Per a analitzar-ho, es van realitzar estudis d'immunofluorescència dels mutants de CIC-2 en els quals es va observar que la reducció dels nivells proteics anava acompanyada d'una deslocalització de les proteïnes defectives, mostrant-se difoses intracel·lularment quedant majoritàriament retingudes en el reticle endoplasmàtic, incapaces d'arribar a la membrana (**Figura 53 A**).

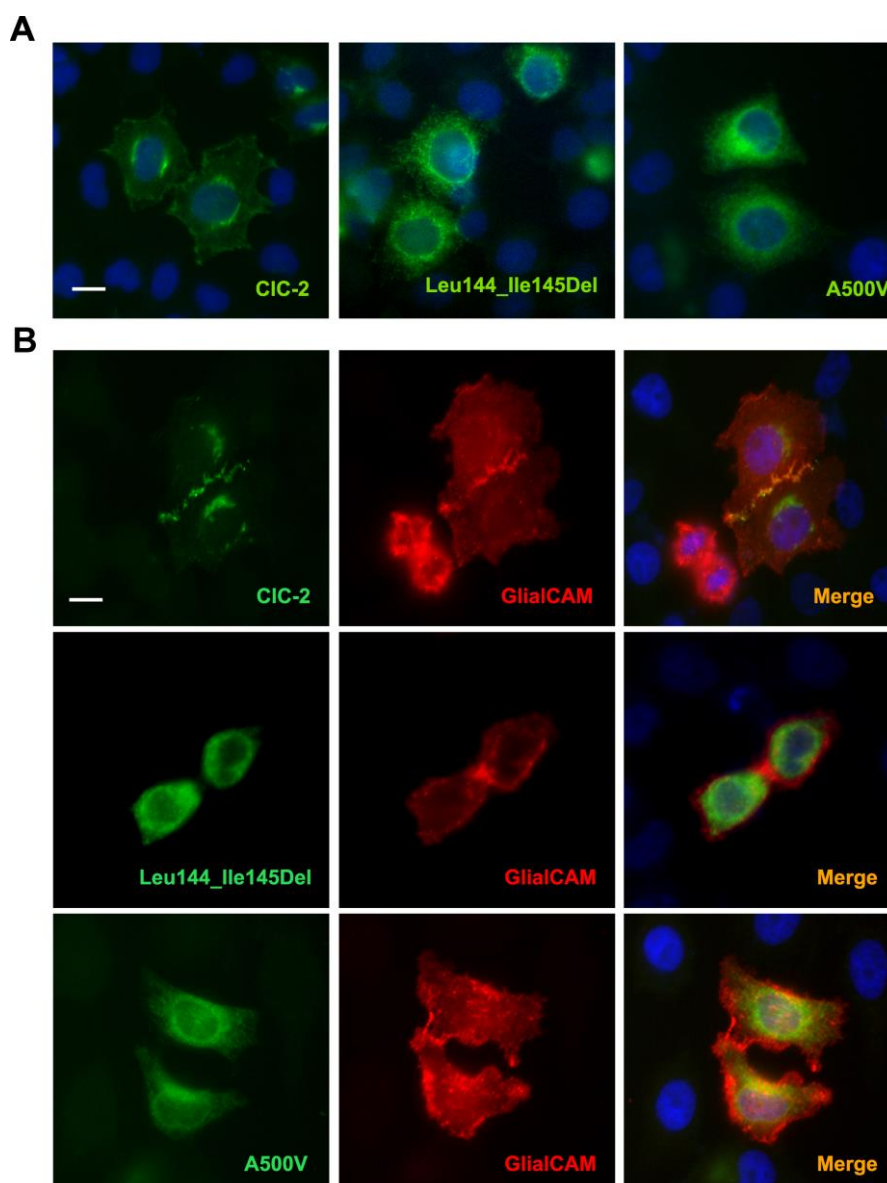


Figura 53. GlialCAM no recupera el defecte de tràfic dels mutants de CIC-2 associats a leucoencefalopaties. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb CIC-2-HA *wild-type* o els mutants a soles (**A**) o cotransfectades amb GlialCAM-Flag (**B**). A les 48 hores post-transfecció es van realitzar estudis

d'immunofluorescència utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítip HA fusionat a CIC-2 (verd) i un anticòs policlonal contra GlialCAM (vermell), en groc (*merge*) es marca la colocalització d'ambdues proteïnes. Les imatges van ser adquirides en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus*. Parelles de cèl·lules van ser analitzades manualment i quantificades segons si la proteïna es concentrava en unions o es localitzava concentrada intracel·lularment (s'empra el programa *Image J* per realitzar el *intensity profile* i discernir entre les localitzacions esmentades). Imatges representatives corresponents a la mitja entre 4- 6 experiments independents. Barra: 20µm.

Després d'observar que els mutants de CIC-2 quedaven majoritàriament retinguts es va estudiar l'efecte que podia tenir la presència de GlialCAM sobre aquests. De la mateixa manera que en l'assaig anterior, es va coexpressar la proteïna CIC-2 *wild-type* o les proteïnes mutades amb GlialCAM i es va determinar la seva localització cel·lular. Els resultats van mostrar com GlialCAM no era capaç de recuperar el defecte de tràfic de les proteïnes mutades de CIC-2, incapaç de localitzar-les a la membrana plasmàtica ni a les unions cel·lulars, quedant-se totalment difoses per el citoplasma (**Figura 53 B**).

De les dues mutacions escollides per a estudiar el rol de GlialCAM en la biogènesi de CIC-2, la mutació A500V semblava ser una mutació menys severa ja que mantenia la capacitat d'interaccionar amb GlialCAM i millorava la seva funció en presència de GlialCAM. Així doncs, es va voler estudiar la relació entre GlialCAM i el mutant A500V en un sistema més proper a la realitat, en un cultiu primari d'astròcits de rata. Per a dur a terme aquest estudi es va amplificar un adenovirus per CIC-2 *wild-type* produït prèviament en el grup i es va produir un adenovirus per sobreexpressar el mutant A500V.

Resultats previs del grup van mostrar com CIC-2 endogen en astròcits es troba localitzat intracel·lularment agregat al voltant del nucli (Jeworutzki et al., 2012). Primer de tot, es va realitzar un assaig d'immunofluorescència en astròcits de rata sobreexpressant la proteïna *wild-type* o la proteïna mutada. Es va observar que la infecció amb la mutació A500V provocava que la proteïna quedés retinguda intracel·lularment, però a diferència de la proteïna *wild-type* que s'observava ben definida al voltant del nucli, aquesta quedava difusa per l'espai citoplasmàtic (**Figura 54**).

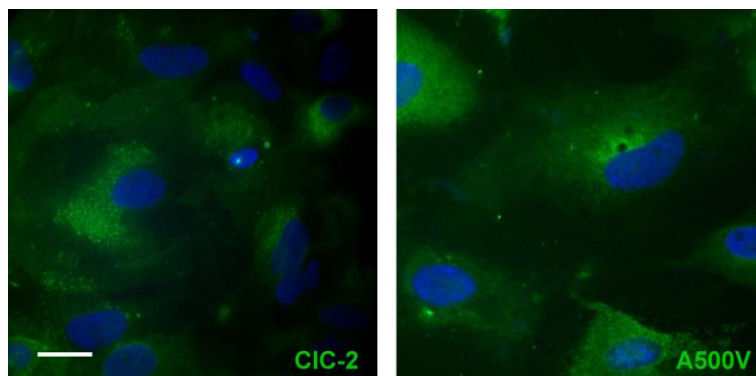


Figura 54. Estudis de localització del mutant A500V de CIC-2 en cultiu primari d'astròcits de rata. Astròcits coinfectats amb adenovirus que expressaven GlialCAM conjuntament amb CIC-2 *wild-type* o el mutant A500V a MOI2, van ser fixades i permeabilitzades per realitzar immunofluorescències fent servir un anticòs monoclonal contra l'epítot HA (fusionat a CIC-2, verd). Les imatges es van adquirir en un microscopi confocal amb *spinning disks DSU Olympus* i són representatives de 3 experiments independents. Barra: 20µm.

Quan es va coinfectar GlialCAM amb CIC-2 *wild-type*, aquest últim, tot i quedar retinguda parcialment, modificava la seva localització concentrant-se en regions de contacte cèl·lula-cèl·lula. En canvi, la sobreexpressió de GlialCAM amb el mutant A500V no va provocar cap millora en el tràfic de CIC-2, quedant la proteïna retinguda en l'espai citoplasmàtic incapaç d'arribar a la membrana plasmàtica (**Figura 55**).

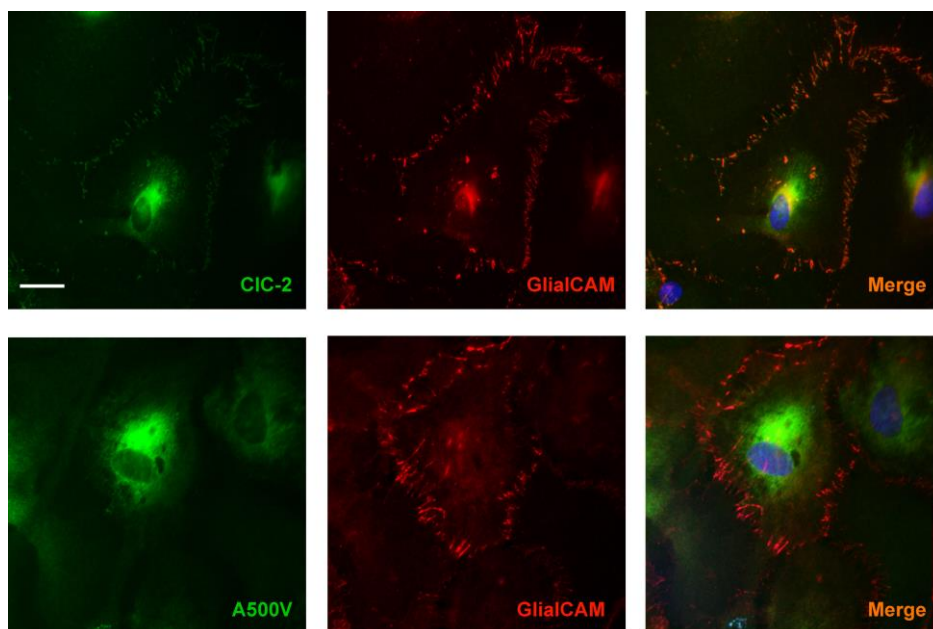


Figura 55. GlialCAM no millora el tràfic del mutant A500V de CIC-2 en cultiu primari d'astròcits de rata. Astròcits coinfectats amb adenovirus que expressaven GlialCAM conjuntament amb CIC-2 *wild-type* o el mutant A500V a MOI2, van ser fixades i permeabilitzades per realitzar immunofluorescències fent servir un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de GlialCAM (vermell) i un anticòs monoclonal contra l'epítot HA fusionat a CIC-2 (verd). La colocalització entre ambdues proteïnes es mostra en groc

(Merge). Les imatges es van adquirir en un microscopi confocal amb *spinning disk DSU Olympus* i són representatives de 3 experiments independents. Barra: 40µm.

El fet que per mitjà d'estudis d'immunofluorescència no es pugui detectar les proteïnes de CIC-2 defectives però que en els estudis electrofisiològics realitzats tant en oòcits de *Xenopus* com en cèl·lules HEK la presència de GlialCAM provoqui una millora en el mutant A500V i que els seus nivells d'expressió proteics es trobin reduïts suggereix que la tècnica d'immunofluorescència no és suficientment sensible per a detectar la poca proteïna mutada que es localitza tant a la membrana com a les unions cel·lulars.

S'estan realitzant nous estudis per a analitzar en més profunditat el procés de translocació cel·lular de la proteïna CIC-2 per mitjà de l'ús del SNAP-tag fusionat a la nostra proteïna d'interès. Una vegada s'ha expressat la proteïna amb el SNAP fusionat es bloqueja aquest epítip amb un reactiu específic (SNAP *Cell-Blocker*) i a partir d'aquest moment només podrem detectar les proteïnes que s'han sintetitzat *de novo* mitjançant l'addició d'un substrat que reconeixerà aquest epítip SNAP. D'aquesta manera podrem analitzar el tràfic subcel·lular de CIC-2 en un experiment *time course* i avaluar si la presència de GlialCAM exhibeix algun efecte de millora en la sortida del reticle endoplasmàtic.

2.2.3. Efecte de les mutacions en *CLCN2* en el procés d'endocitosi de CIC-2.

Atès que GlialCAM no recuperava el defecte de tràfic de CIC-2, ens vam preguntar si aquesta millora per part de GlialCAM en la quantitat de CIC-2 en la membrana era deguda a una modificació del procés d'endocitosi de CIC-2 per part de GlialCAM. Per dur a terme aquest anàlisi es va realitzar un assaig de luminiscència ELISA en cèl·lules que expressaven només CIC-2 *wild-type* o mutants, així com coexpressades amb GlialCAM i es va mesurar els nivells de proteïna en la superfície cel·lular a temps 0 i transcorreguts 5 minuts. Es va observar que la presència de GlialCAM no modificava significativament el percentatge de la proteïna *wild-type* internalitzada, així com cap dels mutants defectius (**Figura 56**).

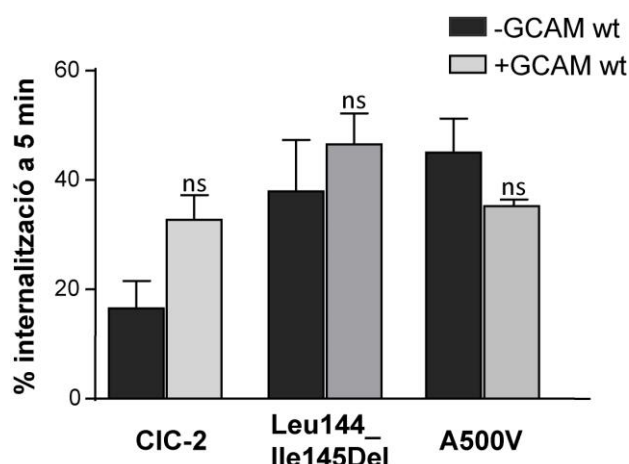


Figura 56. La presència de GlialCAM no modifica el procés d'endocitosi de CIC-2. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els constructs corresponents i es van detectar els nivells de CIC-2 en la membrana plasmàtica als 5 minuts mitjançant un assaig de luminiscència ELISA utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítot HA dels constructs de CIC-2. Dades corresponents a 6 experiments independents, cada condició per triplicat. GCAM: GlialCAM. S'ha utilitzat el test estadístic *t-student*.

2.2.4. Efecte de les mutacions en *CLCN2* en l'estabilitat de CIC-2 a la membrana.

El fet que GlialCAM semblava no afectar al procés d'endocitosi de CIC-2 ens va fer preguntar si GlialCAM estabilitzava CIC-2 a la membrana cel·lular augmentant la taxa de reciclatge de CIC-2 o reduint la seva degradació lisosomal. Per a estudiar el conjunt d'aquests dos processos es va realitzar un seguiment durant 4 hores dels nivells de la proteïna a la membrana cel·lular mitjançant un assaig de luminiscència ELISA a 1, 2 i 4 hores. La presència de GlialCAM no exhibia cap efecte en l'estabilitat de CIC-2 *wild-type* ni del mutant Leu144_Ile145Del però en canvi, incrementava significativament els nivells de proteïna A500V a la membrana cel·lular (**Figura 57**).

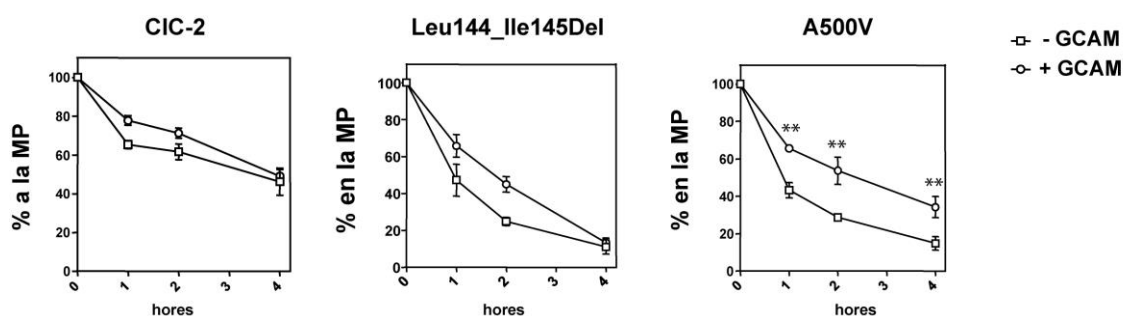


Figura 57. GlialCAM millora l'estabilitat proteica del mutant A500V de CIC-2 a la superfície de la membrana cel·lular. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els constructs corresponents i es van detectar els nivells de CIC-2 a la membrana plasmàtica a 1, 2 i 4h mitjançant un assaig de luminiscència ELISA utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítot HA dels constructs de CIC-2. Dades corresponents a 4 experiments independents, cada condició per triplicat. independents, cada condició per triplicat. GCAM: GlialCAM. S'ha utilitzat el test estadístic *t-student*; ** $p < 0.001$.

Aquests resultats suggerien que GlialCAM exercia un paper estabilitzador en la proteïna mutada A500V mitjançant un augment en el seu reciclatge o inhibint la seva entrada en els lisosomes on CIC-2 seria degradat. Per tant, la millora funcional que GlialCAM desenvolupa sobre la proteïna CIC-2 no es donaria en el reticle

endoplasmàtic millorant la seva sortida sinó que es donaria per un efecte a nivell de la membrana.

Per finalitzar, es va voler estudiar si aquest efecte estabilitzador de GlialCAM sobre la proteïna CIC-2 depenia de la formació d'homocomplexes de GlialCAM. Per a dur a terme aquest assaig, es va coexpressar GlialCAM o un mutant defectiu de GlialCAM (R92W) conjuntament amb la proteïna *wild-type* de CIC-2 o amb les proteïnes defectives i es van determinar els nivells de CIC-2 en la membrana cel·lular.

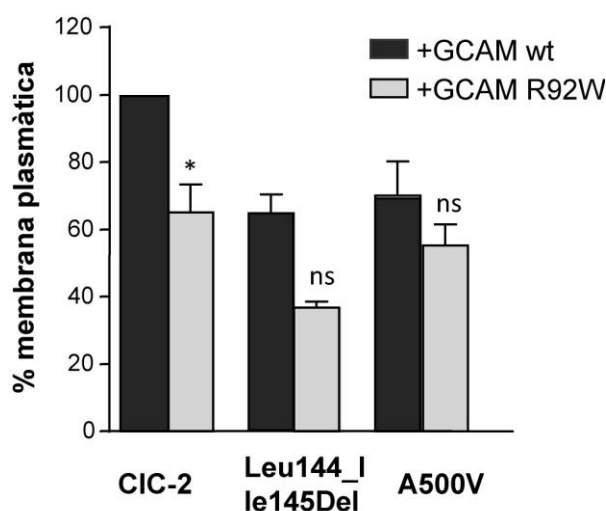


Figura 58. GlialCAM R92W provoca la internalització de CIC-2 Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els constructs corresponents i es van detectar els nivells de CIC-2 en la membrana plasmàtica mitjançant un assaig de luminiscència ELISA utilitzant un anticòs monoclonal contra l'epítot HA dels constructs de CIC-2. Quantificació dels nivells de CIC-2 en la membrana plasmàtica en absència i presència de GlialCAM wild-type. Dades corresponents a 6 experiments independents, cada condició per triplicat. Test *t-student* realitzat, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. GCAM : GlialCAM.

Com es pot observar a la Figura 58, al coexpressar CIC-2 amb el mutant defectiu de GlialCAM R92W els nivells de proteïna CIC-2 a la membrana queien dràsticament, essent només significatiu en la proteïna *wild-type*. Aquesta major internalització de CIC-2 vindria provocada per el defecte de tràfic subcel·lular i d'homooligomerització del mutant R92W de GlialCAM. En canvi, la coexpressió de la proteïna GlialCAM defectiva no provoca un augment en la internalització dels mutants de CIC-2, segurament degut a que aquests provoquen una major internalització *per se* degut a la mutació en CIC-2.

Aquests resultats suggereixen que l'efecte estabilitzador de GlialCAM sobre els nivells de CIC-2 a la membrana plasmàtica requereixi de la formació d'un complex GlialCAM-GlialCAM. Pot ser que la presència de la proteïna GlialCAM defectiva en els mutants de CIC-2, al presentar aquest defecte de *folding* i per tant una major internalització, no pugui proporcionar aquest efecte estabilitzador sobre CIC-2 en la membrana.

CAPÍTOL 3.

Paper de ClC-2 en la fisiologia astrocitària

En el cervell, CIC-2 es localitza en neurones, astròcits i oligodendròcits (Blanz et al., 2007). GlialCAM, MLC1 i CIC-2 es localitzen en les regions de contactes astrocitaris i només GlialCAM i CIC-2 es localitzen també, formant *clusters*, al voltant del soma dels oligodendròcits. Tot i que s'ha descrit que GlialCAM colocalitza amb CIC-2 en astròcits i que també actua com a subunitat auxiliar de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012), en astròcits en cultiu les corrents regulades per CIC-2 mostren unes propietats funcionals típiques de CIC-2 sense estar associat amb GlialCAM (Ferroni et al., 1997; Makara et al., 2003) i només s'observa aquesta modificació del canal quan es sobreexpressa GlialCAM (Jeworutzki et al., 2012) (**Figura 59 A**). Aquest fet suggereix que GlialCAM interaccionaria amb CIC-2 només en determinades circumstàncies, com per exemple durant els períodes d'hiperactivitat neuronal. De la mateixa manera, s'ha descrit que la manca de GlialCAM provocaria la pèrdua de les modificacions del canal en les corrents astrocitàries regulades per CIC-2 (Hoegg-Beiler et al., 2014) (**Figura 59 B**). Així doncs, no es coneix encara quin paper juga GlialCAM sobre CIC-2 en astròcits.

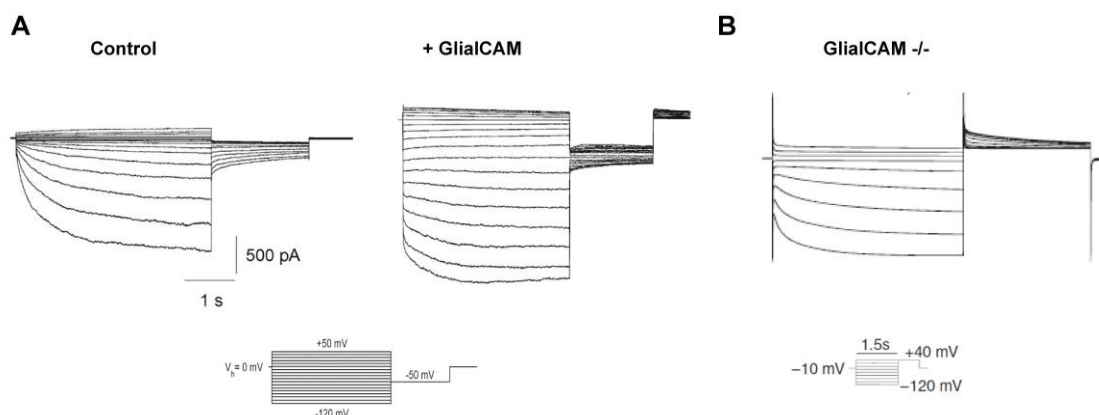


Figura 59. Activitat del canal CIC-2 en astròcits de rata en cultiu. (A) Mesura de les corrents de CIC-2 mitjançant assaigs de *Patch-clamp* en astròcits de rata control i infectats amb adenovirus de sobreexpressió de GlialCAM (+GlialCAM). **(B)** Mesura de les corrents de CIC-2 mitjançant assaigs de *Patch-clamp* en astròcits de ratolí *knock-out* de GlialCAM. Imatge modificada de (Hoegg-Beiler et al., 2014; Jeworutzki et al., 2014).

Per altra banda, tampoc es coneix el paper funcional que juga CIC-2 en els astròcits o en altre cèl·lules. S'han proposat diverses funcions com per exemple que CIC-2 es troba involucrat en la regulació del volum gràcies a la seva sensibilitat intrínseca del volum (Duan et al., 2000). Un altre rol associat a CIC-2 és el manteniment i la correcta funcionalitat de les unions *tight* en l'epiteli intestinal per mitjà de la direcció de la localització d'Occludina a la membrana cel·lular (Nighot and Blikslager, 2012). Per altra banda, s'ha observat que ratolins *knock-out* per CIC-2 presenten vacuoles en la substància blanca, fet que suggereix un paper de CIC-2 en el procés de *potassium siphoning* (Depienne et al., 2013), el qual és necessari pel transport del potassi

secretat per les neurones actives a través del sinciti glial cap als vasos sanguinis (Rash, 2010).

Tot i que resultats previs dels grup demostren la interacció bioquímica i funcional entre GlialCAM i CIC-2, encara no s'entenia perquè mai s'havia registrat *in vivo* la corrent regulada per CIC-2 amb el perfil de corrent que s'observava en el complex GlialCAM/CIC-2 i quina era la rellevància fisiològica per a aquesta interacció, així com el paper de CIC-2 en la fisiologia astrocitària.

En aquest capítol, es vol aprofundir en el paper de CIC-2 en la fisiologia astrocitària i per això, s'ha dividit en dues parts: la primera es centra en el desenvolupament i caracterització d'un model per estudiar l'efecte de la manca de CIC-2 en astròcits, i la segona es centra en la relació bioquímica i funcional entre GlialCAM i CIC-2.

1. DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN MODEL CEL·LULAR PER A L'ESTUDI DE CIC-2 A NIVELL BIOQUÍMIC I FUNCIONAL.

Per poder avançar en l'estudi del rol de CIC-2 en els astròcits, es va desenvolupar i caracteritzar un model cel·lular *knock-down* de CIC-2 en cultius primaris d'astròcits de rata.

1.1. GENERACIÓ DEL MODEL *KNOCK-DOWN* DE CIC-2.

Per obtenir el model *knock-down* es va utilitzar la tecnologia dels micro RNAs (miRNAs) i l'ús d'adenovirus com a vector d'introducció dels miRNAs als astròcits. Es va escollir aquesta tecnologia perquè el model astrocitari presentava uns nivells de transfecció molt baixos, al voltant d'un 20%, que eren insuficients per a generar un model *knock-down*.

Es van dissenyar miRNAs contra diferents regions del RNA missatger (mRNA) de CIC-2 i es va utilitzar un miRNA que no era complementari a cap regió del mRNA (miRNA SCR) com a control d'infecció per adenovirus. Tots els miRNAs generats van ser construïts en un vector que expressava la proteïna esmeralda GFP (esmGFP), i així aconseguir tenir un seguiment efectiu de les cèl·lules que incorporaven el virus.

1.1.1. Desenvolupament del model *knock-down* de CIC-2.

Es van construir miRNAs contra cinc regions diferents del mRNA de CIC-2 (miRNA 77, miRNA 223, miRNA 1047, miRNA 1583 i miRNA 1805) (Veure apartat 1.3.5. de Materials i Mètodes).

En primer lloc, es va fer un estudi de dosi resposta de la infecció a diferents MOIs i a diferents temps d'infecció per a cada determinada MOI. La MOI (*multiplicity of infection*) defineix el nombre de partícules víriques que infecten una única cèl·lula i aquesta MOI d'infecció és diferent en cada proteïna ja que la supressió de la expressió proteica depèn de l'estabilitat de cada proteïna estudiada. Per exemple, en estudis previs del grup, GlialCAM era una proteïna molt més estable que MLC1 i per tant, es necessitava una MOI més alta.

Es va comparar l'expressió de CIC-2 en astròcits sense infectar (Control) respecte a astròcits infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, i els respectius miRNAs de CIC-2. Les MOI d'infecció escollides van ser a MOI 3 i 5, ja que resultats previs del grup mostraven que el model *knock-down* de MLC1 a MOI 5 ja era efectiva i a més a més, en el model *knock-down* de GlialCAM una MOI major a 10 era massa tòxica per a l'astròcit. Aquestes condicions d'infecció es van mantenir durant 3 dies (dades no mostrades) i 7 dies (**Figura 60 A**) en els cultius cel·lulars.

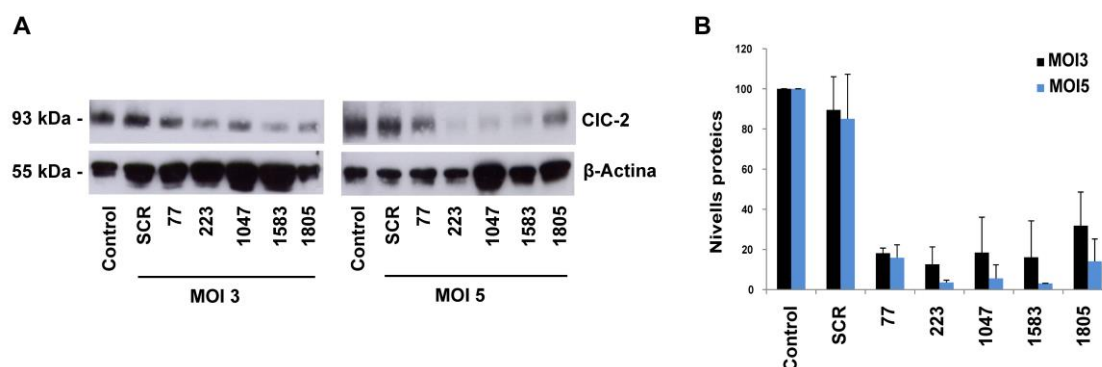


Figura 60. Anàlisi de la reducció de l'expressió de CIC-2 en cultius primaris d'astròcits de rata utilitzant els miRNAs de CIC-2. (A) Astròcits primaris de rata sense infectar (Control) o infectats durant 7 dies amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 77, miRNA 223, miRNA 1407, miRNA 1583 o miRNA 1805 de CIC-2 a diferents MOIs analitzats per WB. S'utilitza un anticòs policlonal contra CIC-2. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. **(B)** Quantificació dels nivells d'expressió de CIC-2 en els grups especificats en A. Es relativitza al 100% d'expressió en els astròcits control. Dades corresponents a 3 experiments independents.

L'expressió de CIC-2 no es veia afectada per la infecció dels miRNAs en cap de les dues MOIs durant 3 dies (dades no mostrades). En canvi, quan es mantenia la infecció amb els miRNAs durant 7 dies sí que es va observar una reducció en els nivells d'expressió de CIC-2 (**Figura 60 B**). La infecció amb el miRNA SCR provocava una petita reducció dels nivells proteics de CIC-2, però aquesta reducció no era significativa. Tots els miRNAs de CIC-2 provocaven una dràstica reducció dels nivells de CIC-2, essent els miRNAs 223, 1407 i 1583 els que mostraven un major efecte silenciador (**Figura 60 B**). Donat que la major caiguda observada es donava a MOI 5 durant 7 dies d'infecció, es van establir aquests paràmetres d'infecció com els òptims i

els miRNAs escollits per a caracteritzar el model *knock-down* de CIC-2 van ser el miRNA 223 i el 1583.

Quan es va analitzar els nivells proteics de CIC-2 es va observar una caiguda del 85%. Aquesta disminució era significativament estadística respecte el miRNA SCR o els astròcits sense infectar (Control) (**Figura 61 A i B**).

En els resultats obtinguts amb els assaigs d'immunofluorescència es va observar com aquesta reducció dels nivells proteics de CIC-2 anava acompanyada d'una pèrdua de l'expressió proteica en el cultiu astrocitari, essent quasi indetectable la proteïna CIC-2 a l'infectar amb els miRNAs 223 i 1583 (**Figura 61 C**).

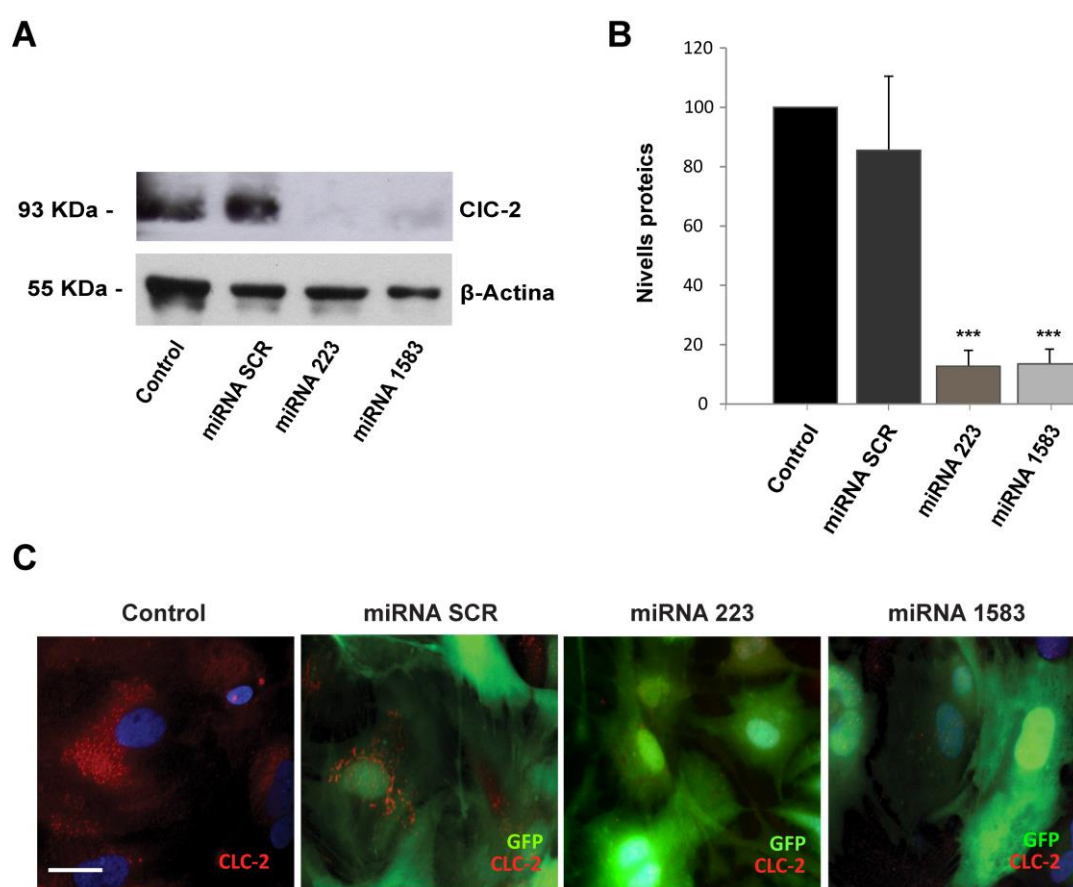


Figura 61. Caracterització del model *knock-down* de CIC-2 en cultius primaris d'astròcits de rata utilitzant els miRNAs generats. (A) Astròcits primaris de rata sense infectar (Control) o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 223 o miRNA 1583 a MOI 5 durant 7 dies, analitzat per WB mitjançant un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. **(B)** Quantificació dels nivells proteics de CIC-2 en les condicions d'infecció representades en A. Es relativitzen els nivells al 100% d'expressió en les cèl·lules Control. Dades corresponents a 6 experiments independents. S'ha utilitzat el test estadístic *t Student* no aparellat. *** $p < 0.001$. **(C)** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA 223 o miRNA 1583 a MOI 5 durant 7 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta CIC-2 endogen (vermell) utilitzant un anticòs policlonal contra la part C-terminal de CIC-2. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNAs. Imatges representatives de 3 experiments independents. Barra: 20µm.

A partir d'ara i per a facilitar la comprensió dels estudis de caracterització del model realitzats en aquesta Tesi, s'anomenarà el miRNA 223 com a miRNA CIC-2₁ i el miRNA 1583 com a miRNA CIC-2₂.

1.1.2. Estudi electrofisiològic del model *knock-down* de CIC-2.

Per a confirmar que la supressió de l'expressió proteica de CIC-2 anava també acompanyada de la supressió funcional del canal es van realitzar estudis electrofisiològics en col·laboració amb el Dr. Xavier Gasull de la Universitat de Barcelona (UB-IDIBAPS). Per a aquest propòsit es van diferenciar els astròcits amb dibutiril AMPc (dBAMPc). Quan les cèl·lules són tractades amb dBAMPc es modifica la seva morfologia, transformant-se en cèl·lules més estrellades on el cos cel·lular no queda tant aixafat, facilitant així el registre. A més a més, s'ha descrit que en aquestes condicions els astròcits expressen el canal de Cl⁻ CIC-2 (Ferroni et al., 1997).

En resultats previs del grup es va estudiar l'activitat CIC-2 comptabilitzant aquells astròcits que presentaven corrents de CIC-2 en condicions isotòniques (40%) ja que no tots els astròcits expressen el RNA missatger de CIC-2 en aquestes condicions (Benesova et al., 2012). Per a confirmar que les corrents eren degudes a l'activitat de canal CIC-2 es observar com aquestes corrents s'inhibien per iode (Jeworutzki et al., 2012), però no per Tamoxifen, un inhibidor de VRAC. També es va addicionar en el medi DCPIB, un potent inhibidor de VRAC (Zhang et al., 2008) (dades no mostrades).

Els estudis electrofisiològics de l'activitat CIC-2 van confirmar la supressió de CIC-2 en els astròcits infectats amb el miRNA CIC-2₁ on es va observar que les corrents de CIC-2 s'inhibien completament (**Figura 62 A i B**) i que el percentatge de cèl·lules que expressaven activitat del canal es reduïa dràsticament (**Figura 62 C**).

Tenint en compte l'efecte observat a nivell d'expressió proteica i de localització subcel·lular de la proteïna CIC-2, es va establir aquest model com a model *knock-down* de CIC-2 en el cultiu primari d'astròcits de rata.

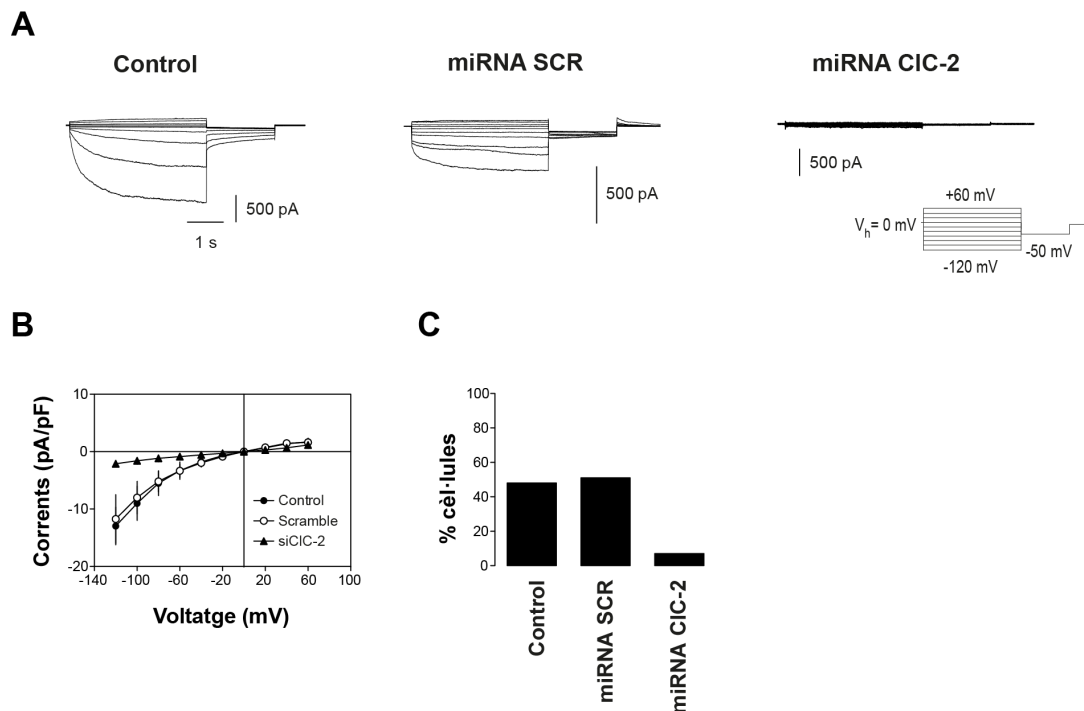


Figura 62. Mesura de l'activitat CIC-2 en el model *knock-down* de CIC-2. (A) Registres representatius de les corrents de clorur detectades en astròcits de rata diferenciats amb dBAMPc sense infectar i infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o miRNA CLC-2₁ a MOI 5 durant 7 dies. (B) Es mostra la representació de la relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady state*) dels astròcits infectats amb les condicions anteriors en condicions isotòniques. (C) Percentatge de cèl·lules que expressen activitat CIC-2. Dades corresponents als següents nombres de registres: Control (n=35), miRNA SCR (n=49); miRNA CIC-21 (n=13).

1.2. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL *KNOCK-DOWN* DE CIC-2.

Un cop generat el model cel·lular *knock-down* de CIC-2 es va voler estudiar l'expressió i localització de GlialCAM i MLC1 en aquest model. Per altra banda, es va estudiar altres proteïnes relacionades amb les unions i el transport com a marcadors astrocitaris.

1.2.1. Estudi de GlialCAM i MLC1 en el model *knock-down* de CIC-2.

Primer de tot, es va estudiar l'expressió i localització de les principals proteïnes involucrades en el desenvolupament de la MLC, GlialCAM i MLC1, mitjançant WB i immunofluorescència en el model *knock-down* de CIC-2 (**Figura 63**). La manca de CIC-2 endògena provocada per la infecció amb el miRNA CIC-2₁ no modificava els nivells d'expressió de GlialCAM o de MLC1. En canvi, quan es va infectar el cultiu primari d'astròcits amb el miRNA CIC-2₂ s'observava una menor expressió tant de GlialCAM, tot i que no significativa, com de MLC1, la qual sí que era lleugerament significativa (**Figura 63 A i B**). Creiem que aquests resultats no es deuen a la manca

de CIC-2 endogen sinó al efecte citotòxic de l'adenovirus miRNA CIC-2₂ ja que el cultiu d'astròcits infectats amb el miRNA CIC-2₂ es veia lleugerament alterat morfològicament respecte els astròcits infectats amb miRNA SCR o miRNA CIC-2₁. Per altra banda, no es va observar cap modificació en la localització de GlialCAM o MLC1 en comparació amb astròcits control o infectats amb miRNA SCR (**Figura 63 C**). Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts en el model *knock-out* de CIC-2, on els nivells proteics de GlialCAM i MLC1 en el cervell així com la seva localització subcel·lular en la glia de Bergmann no es veien modificats per la manca de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012).

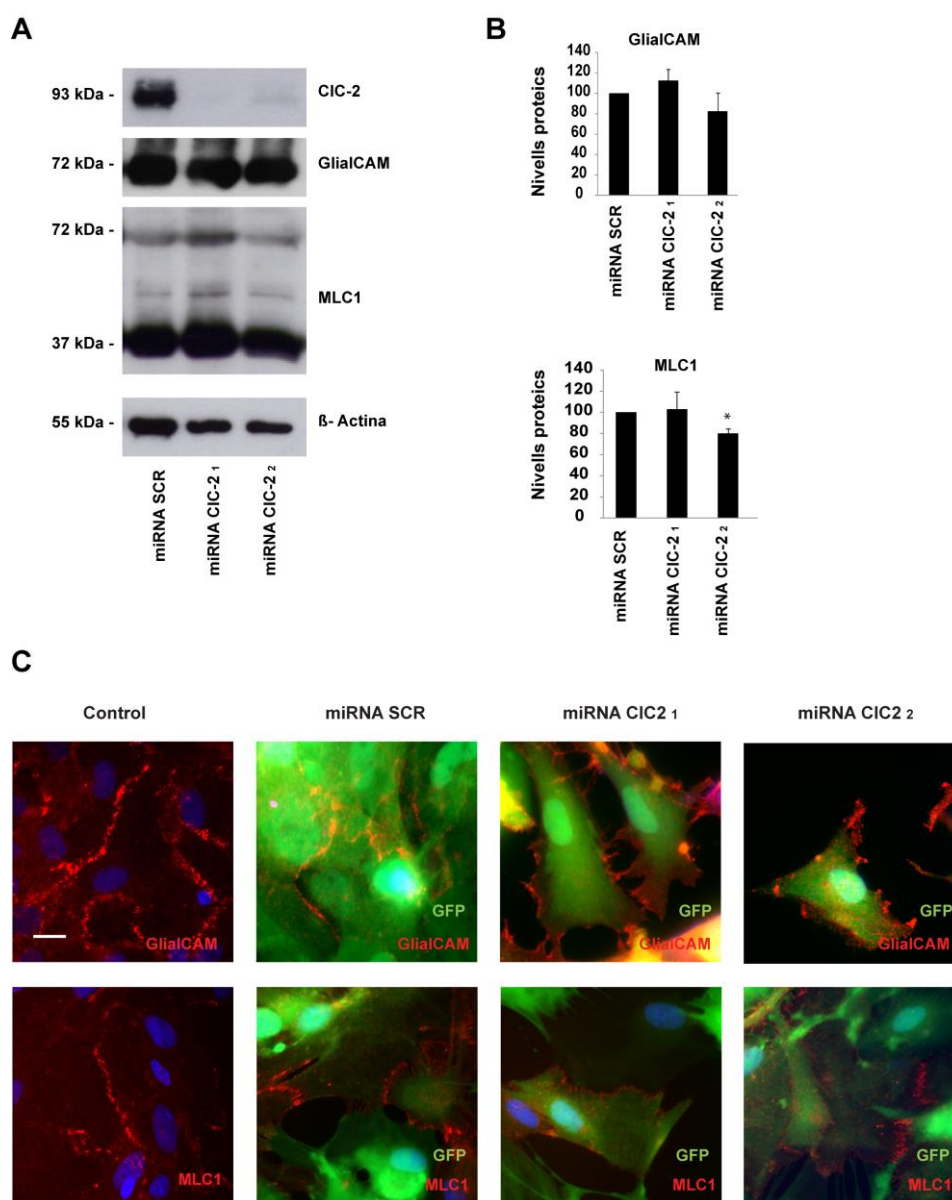


Figura 63. Estudi de GlialCAM i MLC1 en el model *knock-down* de CIC-2. (A) Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI5 durant 7 dies, analitzats per WB. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. (B) Quantificació de l'expressió relativitzada respecte l'expressió en astròcits infectats amb miRNA SCR. Dades corresponents als

següents experiments independents: CIC-2 (n=6), GlialCAM (n=5) i MLC1 (n=4-5). * $p < 0.05$ respecte miRNA SCR; *t Student* no aparellat. **(C)** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI 5 durant 7 dies, analitzats per immunofluorescència. S'utilitza un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de GlialCAM (vermell) i un anticòs policlonal contra la part N-terminal de MLC1. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNA. Barra: 20 μ m.

Així doncs, els resultats obtinguts tant en el model *knock-down* de CIC-2 juntament amb el model *knock-out* per CIC-2 indiquen que tant l'expressió com la localització de GlialCAM i MLC1 a les unions astrocitàries no depenen de la correcta expressió de CIC-2.

1.2.2. Estudi de marcadors proteics d'unions astrocitàries en el model *knock-down* de CIC-2.

CIC-2 juga un paper important en la regulació de la funció de les unions *tight* en l'epiteli intestinal (Nighot et al., 2009). Aquestes unions estan formades per una barreja de proteïnes unides a través de proteïnes citoplasmàtiques al citoesquelet. Les unions *tight* són responsables de la funció de la barrera epitelial i la pèrdua d'aquesta funció provocaria un gran nombre de trastorns intestinals (Turner, 2006). A part del control de la permeabilitat cel·lular, les unions *tight* també es consideren la plataforma de senyalització per a processos cel·lulars tals com la morfogènesis, diferenciació i polaritat cel·lular via la interacció amb elements del citoesquelet, com quinases i fosfatases (Shin et al., 2006). Recentment, s'ha descrit que CIC-2 està involucrat en el desenvolupament de la barrera epitelial així com en el seu manteniment i que CIC-2 regularia la funció de la barrera per mitjà del tràfic de la proteïna d'unions *tight* Occludina a la membrana cel·lular (Nighot and Blikslager, 2012). En aquest treball, es descriu com el model *knock-down* de CIC-2 produïa un retard significatiu en el desenvolupament de la barrera epitelial durant la formació de la monocapa associat a una deslocalització d'Occludina, localitzada difusa en la zona subapical.

A continuació es va voler estudiar, mitjançant la tècnica WB, si l'eliminació de CIC-2 en els astròcits podia estar afectant a l'expressió d'altres proteïnes típiques de les unions astrocitàries (**Figura 64**). No es van observar canvis en l'expressió de cap tipus de proteïna relacionada amb les unions cel·lulars com β -Catenina, proteïna característica d'unions *adherent*, Connexina 43, proteïna característica de les unions tipus *gap* o ZO-1 i Occludina, típiques d'unions *tight*.

Per altra banda, es va mirar la localització de β -Catenina i Connexina 43 i tampoc es va observar cap diferència respecte els astròcits control o infectats amb miRNA SCR (**Figura 64**).

En aquests moments s'estan realitzant experiments d'immunofluorescència per determinar si la manca de CIC-2 afecta a la localització d'Occludina a les unions astrocitàries de manera similar a la deslocalització subapical observada en el ratolí *knock-out* de CIC-2 (Nighot and Blikslager, 2012). Resultats preliminars mostren que la manca de CIC-2 no afecta a la correcta localització de ZO-1 i Occludina a la membrana cel·lular (dades no mostrades).

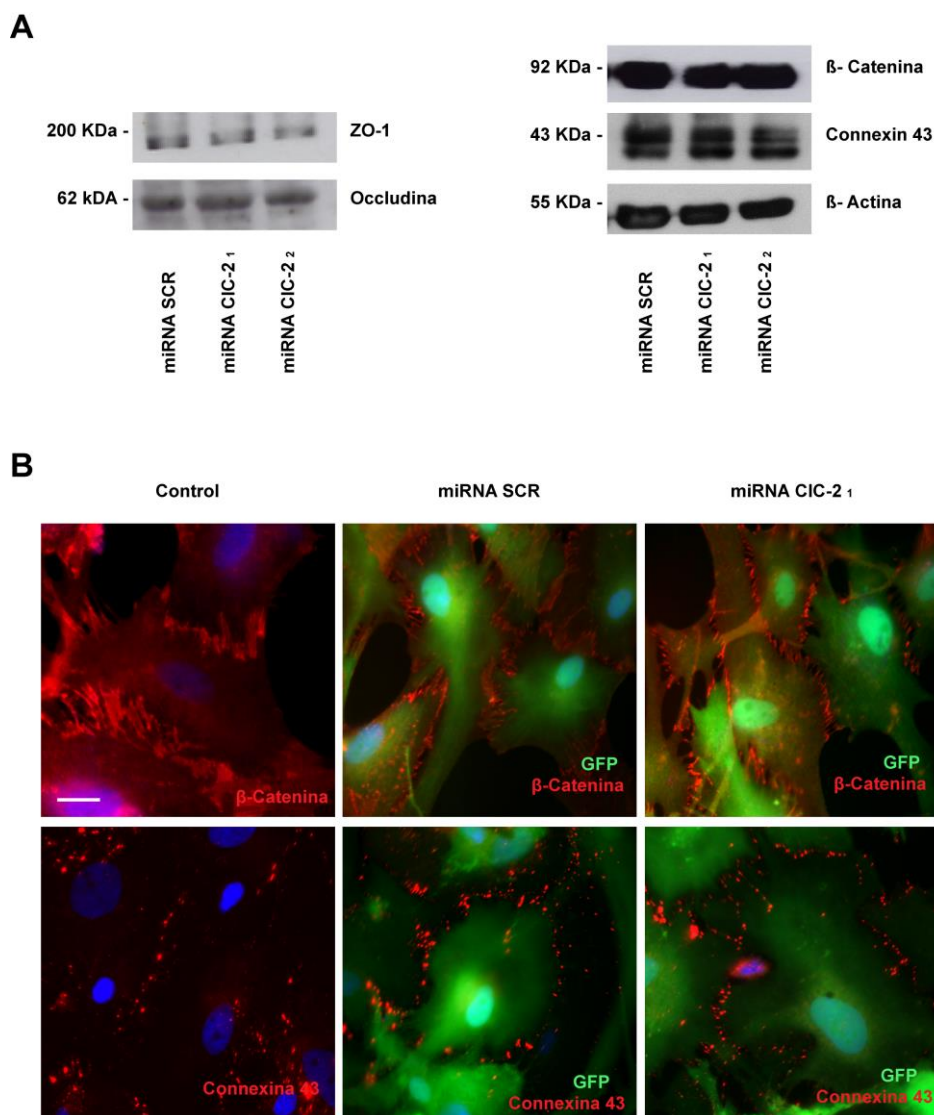


Figura 64. Estudi de marcadors proteics d'unions astrocitàries en el model *knock-down* de CIC-2. (A) Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI5 durant 7 dies, analitzats per WB. S'utilitza β -Actina com a control de càrrega. Es mostra un experiment representatiu de la marca obtinguda amb anticossos específics contra les proteïnes

indicades. **(B)** Astròcits primaris de rata sense infectar o infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI 5 durant 7 dies, analitzats per immunofluorescència. Es detecta Connexina 43 (vermell) o β -Catenina endògenes (vermell) utilitzant anticossos comercials. La senyal GFP determina els astròcits que expressen els miRNA. Barra: 20 μ m.

1.3. RELACIÓ DEL CANAL CIC-2 AMB LA REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR.

Les cèl·lules animals tenen un volum específic, definit i caracteritzat per a cada tipus cel·lular. Atès que la membrana cel·lular és molt permeable a l'aigua, 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 obtenir l'equilibri d'osmòlits, donant lloc a un canvi en el volum cel·lular. La cèl·lula pot augmentar el seu volum com a conseqüència de la reducció externa d'osmòlits (condicions hipoosmòtiques del medi extracel·lular). Moltes cèl·lules disposen del mecanisme RVD en cas d'inflament hipoosmòtic, el qual 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. En el cas del Cl^- s'ha demostrat que hi ha canals de Cl^- *inwardly rectifying* de la família dels CLCs que podrien estar contribuint en l'homeòstasi del volum (Ferroni et al., 1997; Makara, 2003).

Els mecanismes de regulació del volum cel·lular són crítics per al manteniment de la integritat estructural i de les correctes funcions cel·lulars. Així doncs, no és anormal que el canal CIC-2 sigui considerat com un regulador del volum cel·lular a causa de la seva sensibilitat als canvis de volum intrínsecs. Tot i així, el paper de CIC-2 en la regulació del volum pot dependre de la seva expressió relativa envers altres canals de Cl^- activats per inflament.

En el cervell, la disfunció astrocitària és la principal causa en el desenvolupament de malalties cerebrals. En el cas de les leucodistrofies desmielinitzants, l'alteració de la correcta funció astrocitària comporta una degeneració vacuolitzant progressiva de la mielina (Boespflug-Tanguy et al., 2008). Per exemple, els resultats observats en els models murins *knock-out* per a GlialCAM, MLC1 i CIC-2 (Ferroni et al., 1997; Hoegg-Beiler et al., 2014), en els quals la manca de GlialCAM així com MLC1 provoquen la deslocalització de CIC-2 juntament amb l'aparició de vacuoles intracel·lulars i la manca de CIC-2 provoca també l'aparició de vacuoles, suggereixen que CIC-2 juga un paper en l'homeòstasi iònica a través del sinciti glial. Defectes en l'homeòstasi iònica per la

disrupció tant de CIC-2, Kir4.1 com per Cx32/Cx47 probablement provocaran un desequilibri osmòtic que derivarà en la vacuolització mielínica observada (Brignone et al., 2011).

Donat que les cèl·lules infectades expressaven l'esmeralda GFP constitutivament, es podia estudiar fàcilment si la manca de CIC-2 provocava l'aparició de vacuoles intracel·lulars en els astròcits. Els models *knock-down* de GlialCAM i MLC1 generats anteriorment en el laboratori mostraven un fenotip amb presència de vacuoles intracel·lulars. En aquests casos es va considerar que una cèl·lula presentava fenotip vacuolitzant quan s'observava 3 o més vacuoles intracel·lulars amb un diàmetre major a 1µm (Capdevila-Nortes et al., 2013).

En els astròcits infectats amb el miRNA SCR es va observar un petit percentatge de cèl·lules amb vacuoles (7 %), probablement degut a l'efecte tòxic de la infecció per adenovirus. Tot i aquest *background*, l'eliminació de CIC-2 per part dels dos miRNAs provocava un augment significatiu del percentatge de cèl·lules que presentaven vacuoles intracel·lulars d'entre el 15 i el 22% (**Figura 65**).

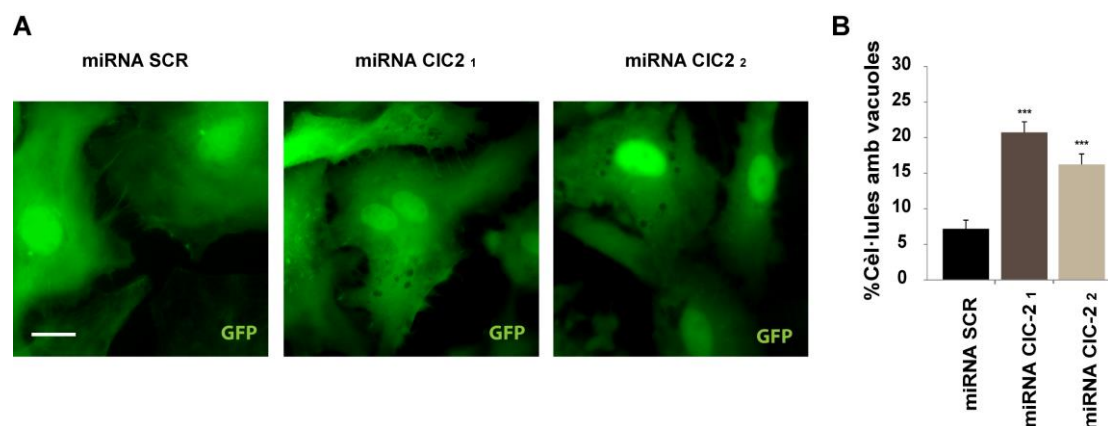


Figura 65. Caracterització fenotípica del model *knock-down* de CIC-2. (A) Cultius primaris d'astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI 5 durant 7 dies. (B) Quantificació del percentatge de cèl·lules que contenen 3 o més vacuoles intracel·lulars d'una mida major a 1µm per a cada condició estudiada. Dades corresponents a 3-5 experiments independents amb el següent nombre de cèl·lules analitzades per cada grup: miRNA SCR (n=2336); miRNA CIC-2₁ (n=1455) i miRNA CIC-2₂ (n=387). ***p<0.001; t Student no aparellat. Barra: 20 µm.

Existeixen evidències *in vitro* que els canals VRAC contribueixen de manera molt important en la resposta als canvis de volum contribuint al procés de RVD (Kimelberg et al., 2006). En astròcits en cultiu, l'augment del volum cel·lular activa les corrents de VRAC, les quals promouen fluxos de Cl⁻ a través de la membrana i influeixen en el flux de petites molècules orgàniques osmòticament actives com la taurina, ATP i

aminoàcids excitatoris (Kimelberg et al., 1990, 2006; Pasantes-Morales and Martín del Río, 1990).

S'ha correlacionat la manca de MLC1, tant en astròcits de rata com en limfoblasts de pacients amb MLC, i la manca de GlialCAM en astròcits de rata amb una disminució de l'activació de l'activitat VRAC (Ridder et al., 2011), activitat que està directament implicada en els mecanismes de regulació del volum cel·lular. Donat que la manca de MLC1 provoca la deslocalització de GlialCAM i CIC-2 (Hoegg-Beiler et al., 2014), en aquests context, es van realitzar estudis de l'activitat VRAC en el model *knock-down* de CIC-2.

Per a realitzar els estudis electrofisiològics en el model *knock-down* de CIC-2 es van diferenciar els astròcits amb dibutiril AMPc (dBAMPC) ja que a part de presentar una millor morfologia per a poder realitzar el registre de les corrents de Cl⁻ també s'ha descrit que en aquestes condicions els astròcits expressen VRAC (Ferroni et al., 1997). Aquests astròcits es van infectar amb els miRNA SCR i el miRNA CIC-2₁ a MOI 5 durant 7 dies.

CIC-2 i VRAC són dos canals que impliquen corrents de Cl⁻ i per tant, s'havia de diferenciar quin tipus de corrent s'estava registrant. Per altra banda, per a estudiar l'activitat VRAC, és necessari assegurar-se que els astròcits a registrar no presentin activitat CIC-2 en condicions isotòniques. D'aquests astròcits, un 85% mostren activitat VRAC en condicions hipotòniques i es va comprovar que els registres eren de l'activitat VRAC observant la inhibició de les corrents per DCPIB però que no és produït cap efecte inhibitor al addicionar al medi iode, inhibidor específic de les corrents regulades per CIC-2 (Capdevila-Nortes et al., 2013).

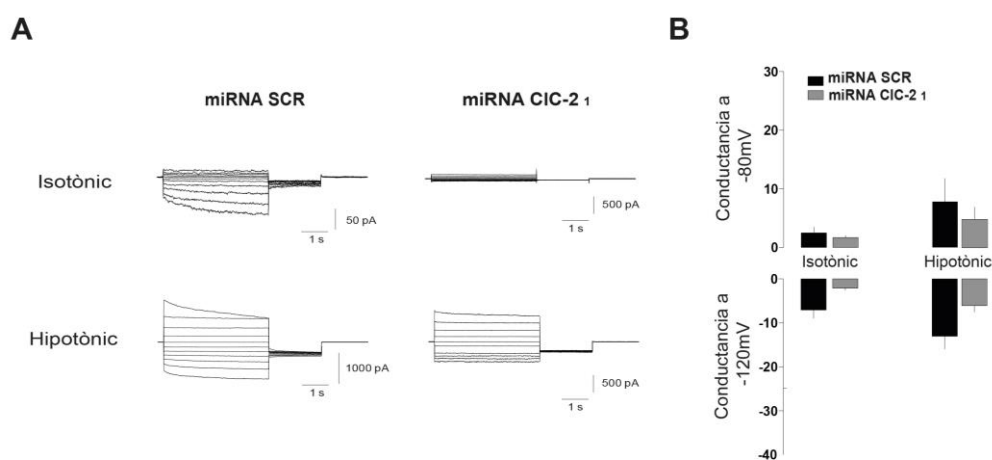


Figura 66. Mesura de l'activitat VRAC en el model knock-down de CIC-2. (A) Registres representatius de les corrents de Cl⁻ detectades en astròcits infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR o

miRNA CIC2₁ a MOI5 durant 7 dies. En el grup miRNA SCR, es va seleccionar astròcits que presentaven corrents de CIC-2 en condicions isotòniques i que presentaven activitat VRAC en condicions hipotòniques. **(B)** Es mostra la corrent mesurada a -80 mV i a -120 mV dels astròcits infectats amb miRNA SCR i miRNA CIC2₁ en condicions isotòniques i hipotòniques.

Es va observar que la supressió de CIC-2 provocava una lleugera reducció, tot i que no significativa, en l'activitat VRAC en condicions hipotòniques respecte l'activitat VRAC mesurada en astròcits infectats amb miRNA SCR (**Figura 66**).

Recentment, s'ha descrit la proteïna LRRC8A com a component essencial per a la modulació de les corrents VRAC (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). La família de les proteïnes LRRC8 (*leucine-rich repeat containnig 8*) consta de 5 paràlegs trobats en diferents cordats els qual s'anomenen LRRC8 A, B, C, D i E (Abascal and Zardoya, 2012). Tot i ser LRRC8A el component essencial, aquest hauria d'adoptar una conformació hexamèrica amb mínimament alguna de les altres proteïnes LRRC8 per donar lloc a l'activitat VRAC, ja que s'ha observat que LRRC8A per sí sol, no dona corrents (Voss et al., 2014).

Per mitjà d'assaigs de WB es va analitzar els nivells d'expressió proteica de LRRC8A i LRRC8D. Els resultats van mostrar com la manca de CIC-2 no afectava als nivells proteics de cap de les dues proteïnes LRRC8 estudiades (**Figura 67**). Encara s'estan realitzant experiments d'immunofluorescència per a estudiar si la manca de CIC-2 influeix en la localització d'aquestes proteïnes.

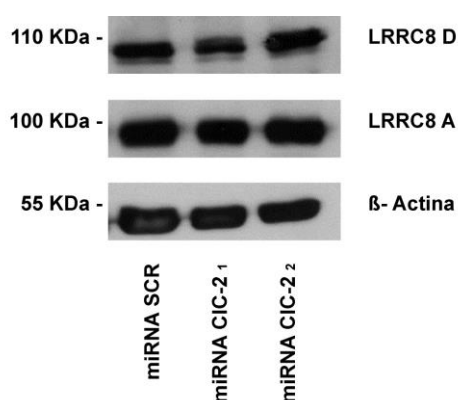


Figura 67. Estudi de marcadors proteics de transport d'ions en el model *knock-down* de CIC-2. **(A)** Astròcits primaris de rata infectats amb adenovirus que expressen miRNA SCR, miRNA CIC-2₁ o miRNA CIC-2₂ a MOI5 durant 7 dies, analitzats per WB. S'utilitza β-Actina com a control de càrrega. Es mostra un experiment representatiu de la marca obtinguda amb anticossos específics contra les proteïnes indicades.

Atès que l'aparició de vacuoles intracel·lulars provocades per la supressió de CIC-2 presentava similituds amb els resultats obtinguts en ratolins *knock-out* de *CLCN2* que mostraven vacuolització en la substància blanca (Blanz et al., 2007) juntament amb la identificació de mutacions en CIC-2 en pacients afectats per leucodistròfies amb

edema intramielínic (Depienne et al., 2013), aquests resultats suggerien que en les cèl·lules glials CIC-2 podria jugar un paper en el manteniment de la integritat de la mielina.

2. RELACIÓ BIOQUÍMICA I FUNCIONAL ENTRE GlialCAM I CIC-2.

Com a resultat de l'activitat neuronal, s'allibera potassi per a repolaritzar el potencial de membrana de la neurona i l'eliminació d'aquest excés per mitjà del procés de *potassium siphoning* és essencial. Les cèl·lules glials, altament permeables als ions de K^+ i amb un potencial de membrana que es despolaritza en períodes d'alta activitat neuronal, capten aquest excés de potassi per mitjà dels canals Kir4.1 i el transfereixen a través d'unions astrocitàries regulades per connexines cap al corrent sanguini, on és eliminat.

En les cèl·lules glials, CIC-2 és necessari per al manteniment de la integritat de la mielina, tal i com s'evidencia per la vacuolització mielínica progressiva del ratolí *knock-out* de CIC-2 (Blanz et al., 2007) juntament amb la identificació de mutacions en CIC-2 en pacients afectats per leucodistròfies amb edema intramielínic (Depienne et al., 2013). La similitud d'aquesta vacuolització amb el fenotip vacuolitzant observat per la disrupció del canal glial de potassi Kir4.1 (Neusch et al., 2001) o per la disrupció de les connexines Cx32 i Cx47 (Menichella et al., 2003) on la supressió del canal s'associa a leucodistròfies caracteritzades per una acumulació d'aigua en la mielina, juntament amb els resultats obtinguts en els models murins *knock-out* per a GlialCAM, MLC1 i CIC-2 (Ferroni et al., 1997; Hoegg-Beiler et al., 2014) suggereix un rol de CIC-2 en l'homeòstasi iònica compensant l'entrada de K^+ a través del canal Kir4.1 en l'astròcit en períodes d'alta activitat neuronal mitjançant l'entrada de Cl^- . Defectes en la funció del canal CIC-2 poden derivar en la vacuolització mielínica observada (Brignone et al., 2011).

2.1 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES GlialCAM i MLC1 EN CONDICIONS D'ALTA CONCENTRACIÓ DE K^+ .

Donat que només era possible observar per immunocitoquímica la proteïna CIC-2 en les unions astrocitàries quan es sobreexpressava conjuntament GlialCAM i CIC-2 i que també era necessària la sobreexpressió de GlialCAM per a que aquesta modifiqués les propietats funcionals del canal CIC-2 endogen, la Dra. Tania López, antiga membre del grup, va realitzar uns estudis preliminars en diferents situacions que poguessin augmentar els nivells de GlialCAM *in vivo* i com a conseqüència modificar CIC-2. Es va

tractar els astròcits de rata en condicions d'hipoosmolaritat i en condicions d'alta concentració de K^+ (60mM), recreant una alta activitat neuronal durant un període d'entre 1 a 6 hores. Es va observar que en cap de les dues condicions, les proteïnes GlialCAM, MLC1 o CIC-2 veien afectats els seus nivells proteics però el tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ sí que semblava provocar un efecte en GlialCAM, incrementant la seva localització en la membrana.

Primer de tot, es va intentar reproduir els resultats preliminars obtinguts en el grup. Per a dur a terme l'experiment, es va incubar grups d'astròcits diferenciats amb AraC amb un medi fisiològic i un altre grup amb un medi d'alta concentració de K^+ durant 6 hores. Mitjançant la tècnica de WB es va observar com GlialCAM no modificava els seus nivells proteics quan s'incubava en un medi d'alta concentració de K^+ (ALT K^+) en cap període de la incubació (**Figura 68 A**).

Es va estudiar l'efecte del K^+ sobre la localització de GlialCAM endogen detectant la proteïna amb dos anticossos diferents (**Figura 68 B i C**), un que detectava l'extrem C-terminal de GlialCAM i l'altre, detectava un epítot fusionat a l'extrem N-terminal. En ambdós casos les imatges i el tractament post-imatge es van realitzar en les mateixes condicions d'intensitat (*time exposure*) en el microscopi.

Primer de tot es va realitzar una immunofluorescència no permeabilitzant per detectar només aquell GlialCAM localitzat a la membrana utilitzant un anticòs monoclonal contra la regió extracel·lular de la proteïna. Es va observar que els astròcits tractats amb el medi amb alt contingut de K^+ semblaven presentar una marca mínimament més intensa de GlialCAM a la membrana plasmàtica, tot i que aquest augment d'intensitat era molt subtil (**Figura 68 B**).

Els mateixos resultats es van obtenir al realitzar una immunofluorescència permeabilitzant utilitzant un anticòs policlonal contra la part C-terminal de GlialCAM (**Figura 68 C**). Al ser GlialCAM una proteïna de membrana, i per tant en condicions fisiològiques ja es troba localitzada en la membrana no va ser possible quantificar l'efecte de l'alta concentració de K^+ en aquest petit augment visual de GlialCAM.

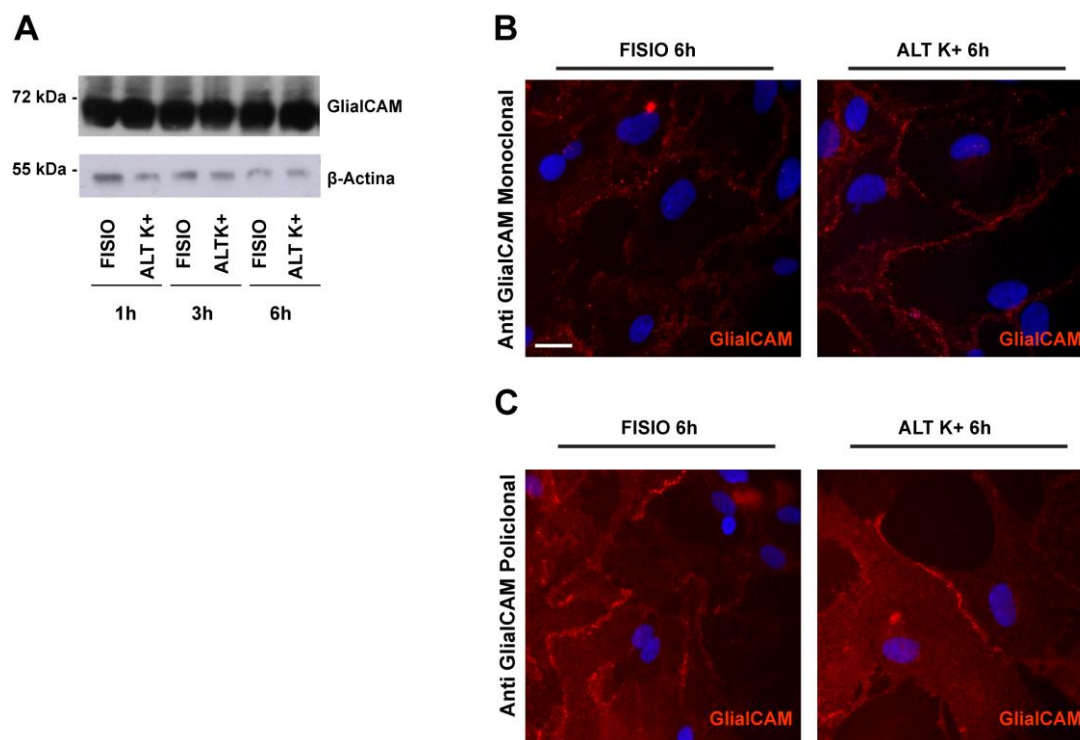


Figura 68. Anàlisi de la proteïna GlialCAM en astròcits de rata tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ . (A) Nivells proteics de GlialCAM mitjançant WB a diferents temps d'incubació (1h, 3h, 6h) dels astròcits en medi fisiològic o amb un medi amb una alta concentració de K^+ (60 mM). Dades corresponents a 4 experiments independents. S'utilitza β -Actina com a control de càrrega. (B) Astròcits de rata tractats amb medi fisiològic o amb un medi amb una alta concentració de K^+ (60 mM) durant 6 hores. Mitjançant immunofluorescència no permeabilitzant es detecta GlialCAM amb un anticòs monoclonal contra una regió de la part extracel·lular de la proteïna (vermell). Imatges representatives de 7 experiments independents. (C) Astròcits de rata tractats amb medi fisiològic o amb un medi amb alta concentració de K^+ (60 mM) durant 6 hores. Mitjançant immunofluorescència es detecta GlialCAM amb un anticòs policlonal contra la regió C-terminal de la proteïna (vermell). Imatges representatives de 6 experiments independents FISIO: medi fisiològic; ALT K+: medi amb alta concentració de K^+ . Barra: 20 μ m.

De la mateixa manera com s'havia analitzat l'efecte del tractament d'un medi d'alta concentració de K^+ en GlialCAM, es va estudiar l'efecte en l'expressió i localització de MLC1 endogen. Es va observar que tal i com succeïa en els nivells proteics de GlialCAM, el tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ no modificava els nivells d'expressió proteica de MLC1 (**Figura 69 A**).

Posteriorment es va analitzar la localització de MLC1 en astròcits tractats amb el medi que contenia una alta concentració de K^+ . La intensitat de la proteïna semblava augmentar a la membrana plasmàtica, però així com GlialCAM, MLC1 és una proteïna que es localitza en la membrana en situacions fisiològiques i per tant tampoc es podia afirmar que hi hagués un augment a la membrana per l'efecte del K^+ (**Figura 69 B**).

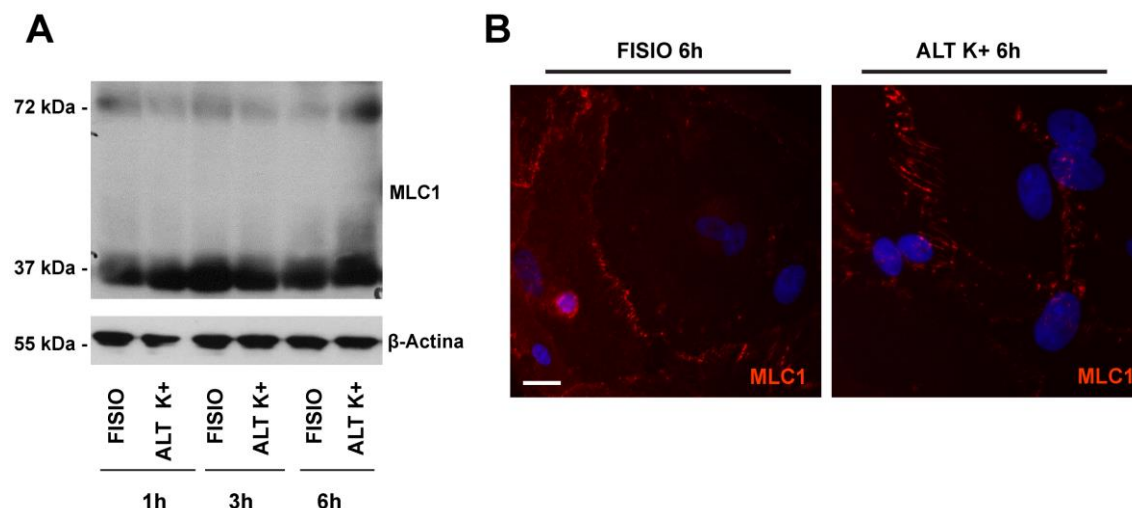


Figura 69. Anàlisi de la proteïna MLC1 en astròcits de rata tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ . (A) Nivells proteics de MLC1 analitzats mitjançant WB a diferents temps d'incubació (1h, 3h, 6h) astròcits en medi fisiològic o en un medi amb alta concentració de K^+ (60 mM). Dades corresponents a 4 experiments independents. S'utilitza β -Actina com a control de càrrega. (B) Astròcits de rata tractats amb medi fisiològic o amb un medi d'alta concentració de K^+ (60 mM) durant 6 hores. Mitjançant immunofluorescència es detecta MLC1 amb un anticòs policlonal contra la regió N-terminal de la proteïna (vermell). FISIO: medi fisiològic; ALT K^+ : medi amb alta concentració de K^+ . Barra: 20 μ m.

2.2. ANÀLISI DE LA PROTEÏNA CIC-2 EN CONDICIONS D'ALTA CONCENTRACIÓ DE K^+ .

2.2.1. Localització subcel·lular de CIC-2 en condicions d'alta concentració de K^+ .

A continuació, es va estudiar l'efecte del K^+ sobre CIC-2 en les mateixes condicions en que s'havia analitzat GlialCAM i MLC1. En estudis previs de la Dra. Tania López, no es va poder treure cap resultat concloent ja que l'anticòs que es disposava en aquell moment no era del tot específic per a detectar la proteïna per els assaigs d'immunofluorescència. Posteriorment es van poder realitzar aquests experiments gràcies a la generació d'un nou anticòs contra CIC-2 produït durant la realització d'aquesta Tesi.

Seguint les mateixes condicions experimentals per GlialCAM i MLC1 es va tractar astròcits diferenciats durant 6 hores amb un medi amb una alta concentració de K^+ . Per mitjà de WB es va analitzar els nivells proteics de CIC-2 i es va determinar que l'alta concentració de K^+ en el medi tampoc els alterava (**Figura 70 A**).

Sorprenentment, quan es van realitzar estudis de localització de CIC-2 en les condicions anteriorment descrites es va observar que el tractament amb un medi d'alta

concentració de K^+ provocava una modificació del tràfic de CIC-2, localitzant-se a les membranes d'alguns astròcits així com en unions cel·lulars (**Figura 70 B**).

Donat que la intensitat de la marca de CIC-2 endogen a les membranes cel·lulars era bastant suau i que tant el tractament amb el medi fisiològic com amb el medi d'alta concentració de K^+ provocaven un augment del *background*, es va optar per sobreexpressar la proteïna en astròcits de rata mitjançant la infecció d'un adenovirus que expressés CIC-2 fusionat a un epítot Flag. Es va infectar el cultiu d'astròcits amb aquest adenovirus de sobreexpressió 48h abans del tractament, temps necessari per a que les cèl·lules expressin la proteïna. Es va realitzar el tractament amb les mateixes condicions que en els casos anteriors i es va detectar la proteïna amb un anticòs que reconeixia l'epítot Flag. De la mateixa manera que per la proteïna endògena, el tractament amb alta concentració de K^+ provocava que CIC-2 es localitzés en la membrana plasmàtica i a les unions cel·lulars. La senyal obtinguda era d'una intensitat major i més definida (**Figura 70 C**).

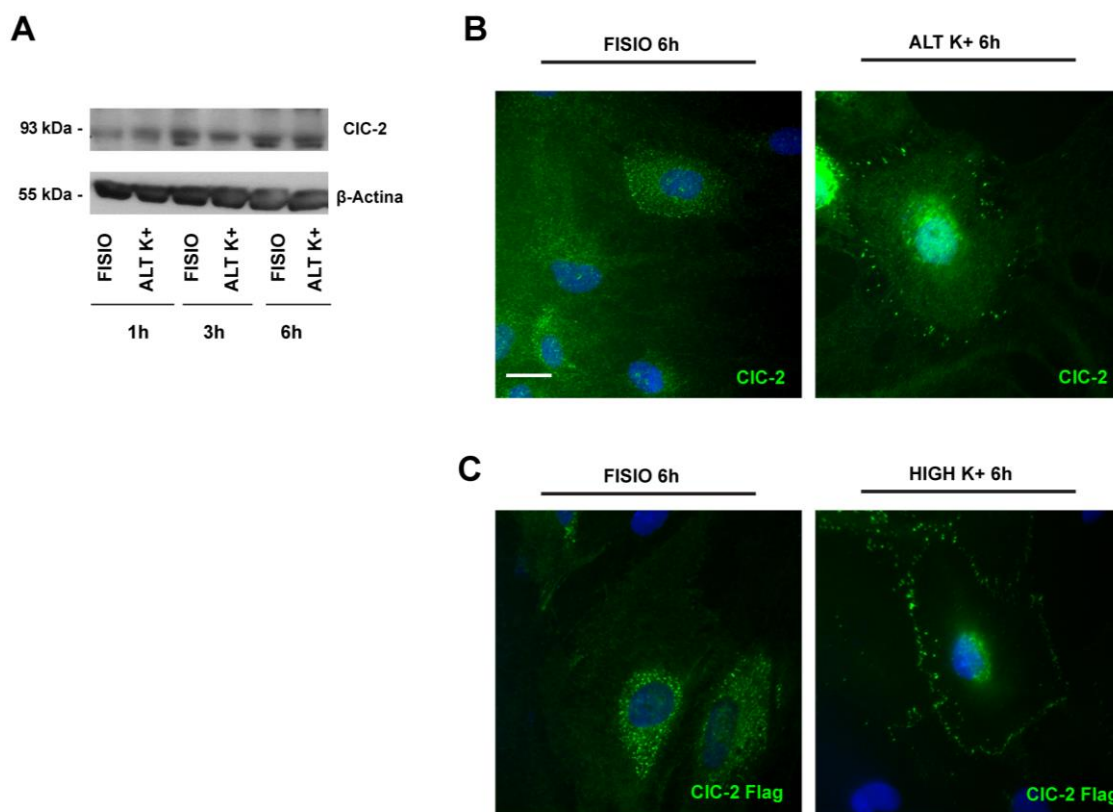


Figura 70. Anàlisi de la proteïna CIC-2 en astròcits de rata tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ . (A) Nivells d'expressió de CIC-2 analitzats per mitjà de WB dels astròcits tractats a diferents temps (1h, 3h i 6h) amb un medi fisiològic i un medi d'alta concentració de K^+ (60 mM). Dades corresponents a 4 experiments independents. S'utilitza β -Actina com a control de càrrega. (B) Localització de CIC-2 endogen en astròcits de rata tractats amb un medi fisiològic i un medi d'alta concentració de K^+ (60 mM) durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. S'utilitza un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2.

Imatges representatives de 6 experiments independents. **(C)** Localització en astròcits de rata infectats amb adenovirus que expressa CIC-2-Flag i posteriorment tractats amb un medi fisiològic i un medi d'alta concentració de K^+ (60 mM) durant 6 hores mitjançant immunofluorescència. S'utilitza un anticòs monoclonal contra l'epítot Flag fusionat a CIC-2. Imatges representatives de 3 experiments independents. FISO: medi fisiològic; ALT K^+ : medi amb alta concentració de K^+ . Barra: 20 μ m.

2.2.2. Mesura de les corrents regulades per CIC-2 en condicions d'alta concentració de K^+ .

Després d'aquests interessants resultats es va col·laborar altre cop amb el Dr. Xavier Gasull per analitzar com l'efecte de l'alta concentració de K^+ podia afectar a l'activitat del canal CIC-2.

Es va tractar el cultiu primari d'astròcits de rata amb les mateixes condicions que anteriorment, un medi fisiològic i un medi d'alta concentració de K^+ durant 6 hores, i es van analitzar les corrents de CIC-2 (**Figura 71**). Els astròcits tractats amb medi fisiològic mostraven les traces típiques de les corrents de Cl^- regulades per CIC-2 a potencials negatius. En canvi, les corrents de Cl^- observades en els astròcits tractats amb el medi d'alta concentració de K^+ presentaven una modificació en l'activació, donant lloc a un perfil molt similar al obtingut en sobreexpressar GlialCAM, activant-se també a potencials positius, tret característic de l'efecte de GlialCAM en el canal CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012) (**Figura 71 A**). En canvi, en cèl·lules infectades amb l'adenovirus miRNA CIC-2₁, el tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ no provocava cap efecte en les corrents de Cl^- regulades per CIC-2.

En condicions d'alta concentració de K^+ , s'incrementaven dràsticament l'amplitud de les corrents i es va observar una menor rectificació (**Figura 71 B**), aquest increment era major que l'observat en condicions de sobreexpressió de GlialCAM.

Aquests resultats, juntament amb els estudis de localització de GlialCAM i CIC-2 assenyalaven que l'alta concentració de K^+ en el medi era la condició necessària per a que CIC-2 fos capaç de localitzar-se a les membranes i unions astrocitàries i modifiqués les seves propietats de canal. Així doncs, podria ser que en condicions d'alta concentració de K^+ fos quan es formés el complex GlialCAM/CIC-2 i aquest fos capaç de modificar el tràfic de CIC-2 localitzant-lo a les membranes i unions cel·lulars així com les seves propietats funcionals.

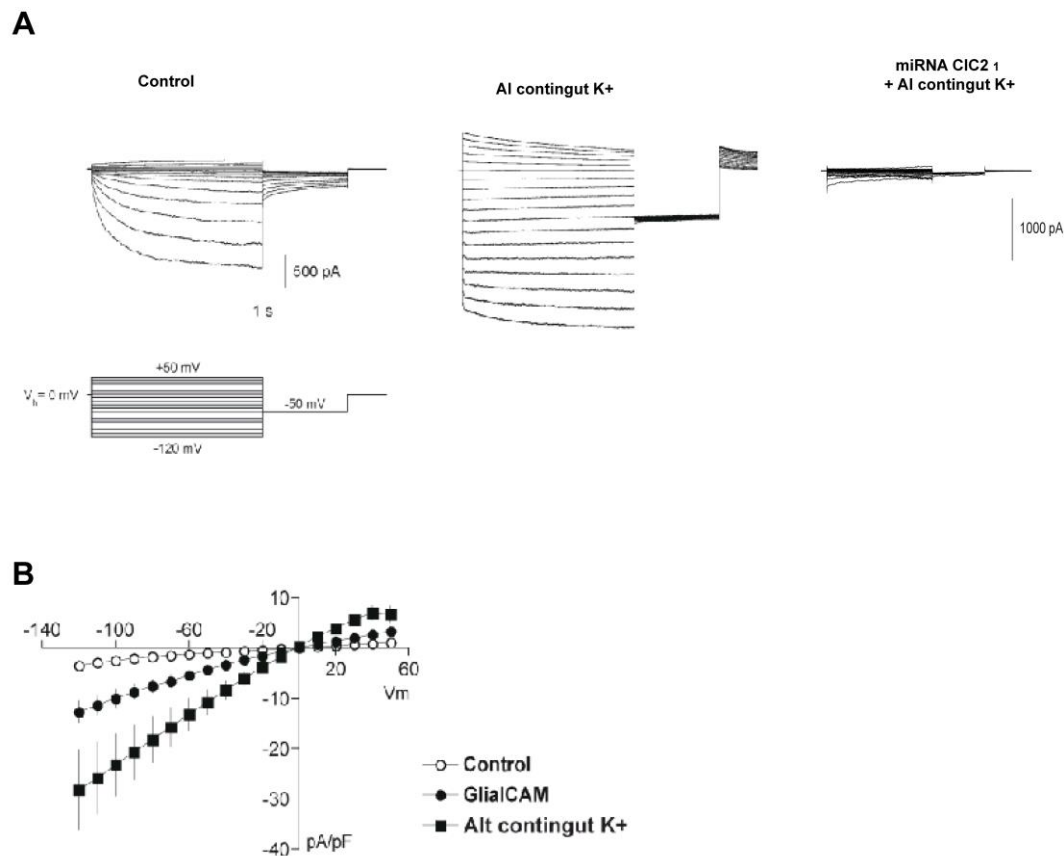


Figura 71. Mesura de l'activitat CIC-2 en astròcits de rata tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ . **(A)** Registres representatius de les corrents de Cl^- detectades en astròcits de rata diferenciats amb dBAMPc. Es representa un registre típic de les corrents de Cl^- a través del canal CIC-2 en cèl·lules tractades amb medi fisiològic (Control), amb alta concentració de K^+ (60 mM) i en astròcits infectats amb adenovirus que expressen miRNA CIC-2₁ tractats posteriorment amb un medi d'alta concentració de K^+ (60 mM). Dades corresponents a 10 cèl·lules registrades per condició. **(B)** Relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady State*) en astròcits tractats amb medi fisiològic (Control), sobreexpressant GlialCAM i tractats amb un medi fisiològic (GlialCAM) i en astròcits tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ (Alt contingut K^+).

Un cop establert que l'alta concentració de K^+ era l'estímul que provocava el canvi de localització de CIC-2 es va voler estudiar on es localitzava CIC-2 a l'espai subcel·lular en condicions normals. Es va realitzar un assaig d'immunofluorescència en astròcits de rata per detectar la localització de CIC-2 endogen i alhora es va detectar el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. Es va observar com CIC-2 no colocalitzava amb el reticle endoplasmàtic (**Figura 72 A**) però sí que colocalitzava amb l'aparell de Golgi (**Figura 72 B**).

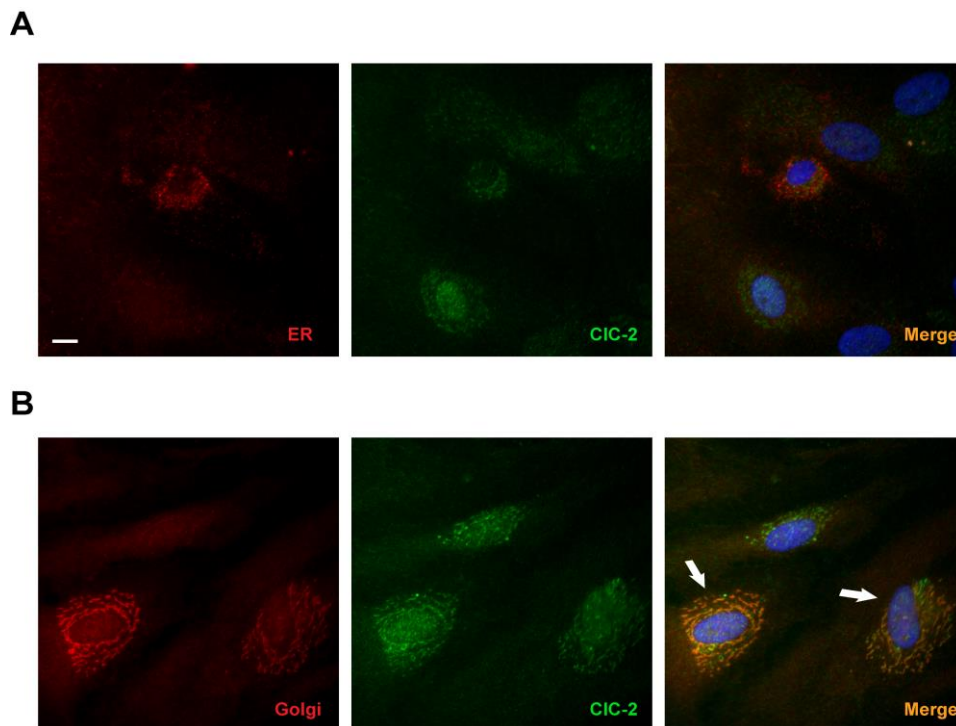


Figura 72. Localització subcel·lular de CIC-2 en astròcits de rata en condicions fisiològiques. Astròcits de rata diferenciats amb AraC van ser fixats i permabilitzats. **(A)** Es realitza un assaig d'immunofluorescència amb un anticòs policlonal contra la part C-terminal de CIC-2 (verd) i un anticòs monoclonal comercial contra el Reticle Endoplasmàtic (vermell). **(B)** Es realitza un assaig d'immunofluorescència amb un anticòs policlonal contra la part C-terminal de CIC-2 (verd) i un anticòs monoclonal comercial contra l'aparell de Golgi (vermell). En groc (merge) es mostra la colocalització de les dues proteïnes. Les fletxes assenyalen les cèl·lules on s'observa colocalització de les dues proteïnes. Dades corresponents a 3 experiments independents. Barra: 20 μm .

2.2.3. Relació dosi-resposta del tràfic de CIC-2 a diferents concentracions de K^+ .

L'activitat sinàptica neuronal allibera K^+ al medi extracel·lular. Aquesta concentració extracel·lular de K^+ necessita una fina regulació ja que la seva acumulació en l'espai extracel·lular pot alterar l'excitabilitat neuronal, l'alliberació de neurotransmissors, el metabolisme de la glucosa i el reg sanguini cerebral (Theodosios et al., 2008). El cervell està preparat per a resistir concentracions de K^+ de 3 mM (Moghaddam and Adams, 1987), però pot suportar un increment de concentració de K^+ fins a 10-12 mM en períodes d'estimulació elèctrica.

Donat que s'estava treballant a una concentració de K^+ major a la concentració fisiològica d'hiperactivitat neuronal es va voler analitzar si l'efecte de la concentració de K^+ s'observava a una concentració més propera a la que té lloc en el cervell en una situació ordinària d'alta activitat neuronal.

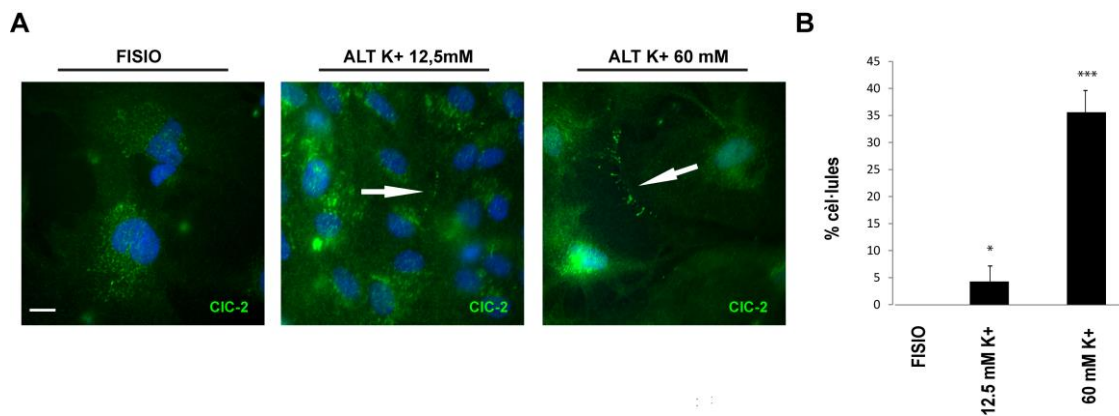


Figura 73. Anàlisi de l'efecte del K^+ en astròcits de rata a diferents concentracions. (A) Astròcits de rata tractats amb un medi fisiològic i amb un medi d'alta concentració de K^+ (12,5 mM; 60 mM) durant 6 hores. Es realitza un assaig d'immunofluorescència per a detectar CIC-2 endogen utilitzant un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2. Barra: 20 μ m. **(B)** Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten CIC-2 a les unions cel·lulars. Dades corresponents a 5-12 experiments independents, i el número de cèl·lules corresponents: FISIO (n=694), 12,5 mM K^+ (n=931) i 60mM K^+ (n=1059). S'ha realitzat el test estadístic *one sample t-test*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Els resultats obtinguts indicaven que per mitjà d'assaigs d'immunofluorescència en astròcits tractats amb medi fisiològic mai es detectava CIC-2 a la membrana, quedant delimitat a l'aparell de Golgi (**Figura 73 A i B**). En canvi al tractar les cèl·lules amb un medi d'alta concentració de K^+ , CIC-2 es localitzava en els processos astrocitaris (**Figura 73 A**). Aquesta modificació del tràfic de CIC-2 era major a concentracions altes de K^+ (60 mM) on CIC-2 s'observava a les membranes d'un 36% de cèl·lules, en canvi a concentracions fisiològiques d'alta activitat neuronal (12,5 mM K^+) s'observava tan sols un 4 % de les cèl·lules que expressaven CIC-2 en la membrana (**Figura 73 B**). En aquests moments, s'estan realitzant més experiments per estudiar l'efecte d'una concentració de K^+ intermitja i per analitzar, així la dosi dependència del K^+ .

2.2.4. Estudis *time-course* del tràfic de CIC-2 en condicions d'alta concentració de K^+ .

Posteriorment, es va voler estudiar l'efecte del K^+ en el tràfic de CIC-2 a diferents temps de tractament. Per a realitzar aquest estudi es van tractar els astròcits amb un medi d'alta concentració de K^+ i es va realitzar un assaig de *time-course* a 30 min, 1, 3 i 6h. L'efecte del K^+ en la localització de CIC-2 era visible a partir dels 30 minuts de tractament, tot i que la intensitat de senyal a la membrana anava augmentat a mesura que s'incrementava el temps de tractament (**Figura 74 A**). Es va observar també, que a mesura que s'augmentava el temps de tractament amb el medi d'alta concentració de K^+ s'incrementava el percentatge de cèl·lules que presentaven CIC-2 en la membrana (**Figura 74 B**), tot i que aquest augment no era significatiu. Aquests

resultats són preliminars i necessiten realitzar-se més experiments per extreure una conclusió.

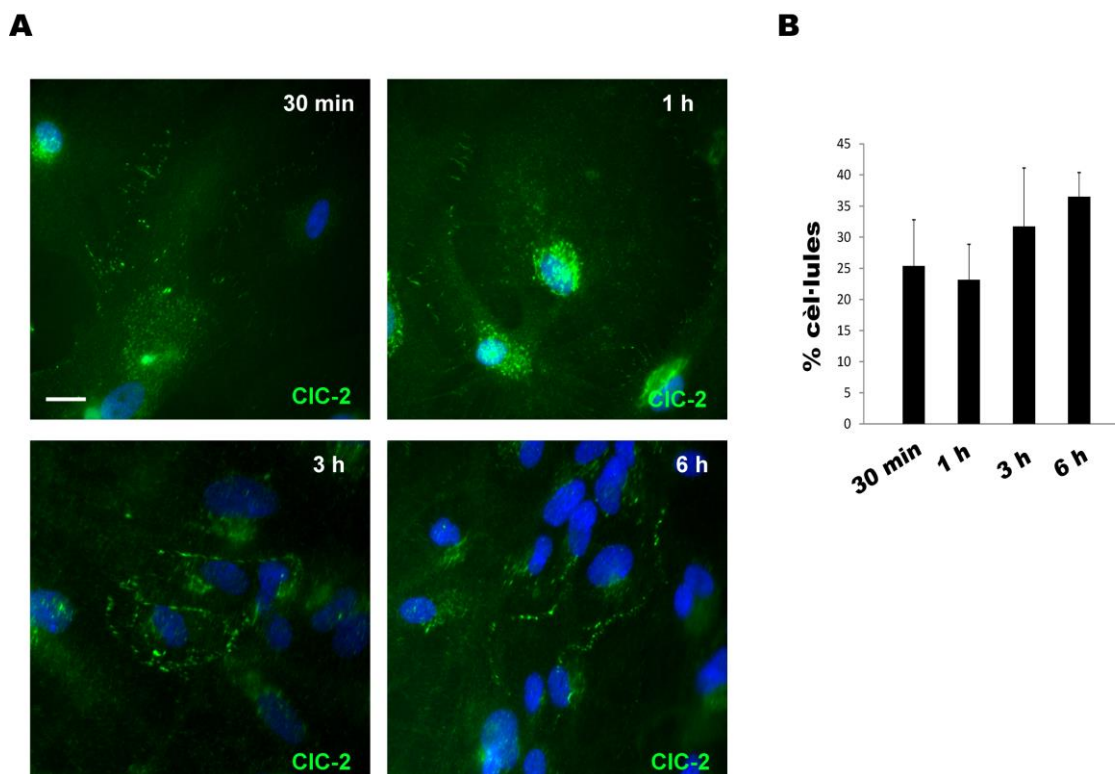


Figura 74. Anàlisi *time-course* del l'efecte del tractament d'astròcits de rata amb un medi d'alta concentració de K^+ . (A) Astròcits de rata tractats amb un medi amb alta concentració de K^+ durant 30 minuts, 1h, 3h i 6 hores. Es realitza un assaig d'immunofluorescència per a detectar CIC-2 endogen utilitzant un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2. (B) Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten CIC-2 a la membrana cel·lular. Dades corresponents a 3 experiments independents, i el número de cèl·lules corresponents: 30 minuts (n=350) , 1h (n=261), 3h (n=298) i 60mM K^+ (n=1059). Barra: 20 μ m.

2.2.5. Reversibilitat de l'efecte de l'alta concentració de K^+ en el tràfic de CIC-2.

A continuació, es va voler estudiar si l'efecte del K^+ observat era reversible. Per a aquest propòsit, es van tractar astròcits de rata amb un medi fisiològic o d'alta concentració de K^+ durant 6 hores i posteriorment es va substituir el medi d'alta concentració de K^+ per un medi fisiològic i es va mantenir durant dues hores més. Quan es va detectar CIC-2 per mitjà d'assaigs d'immunofluorescència, es va observar que l'efecte del K^+ era clarament revertit al tractar els astròcits amb el medi fisiològic, confirmant que aquest efecte del K^+ era reversible (**Figura 75**). Aquesta reversió segurament es deu a que quan els nivells d'activitat neuronal disminueixen, ja no és necessari que el canal CIC-2 permeti l'entrada de Cl^- a l'interior de la cèl·lula i per tant no cal que estigui concentrat a la membrana i les unions cel·lulars.

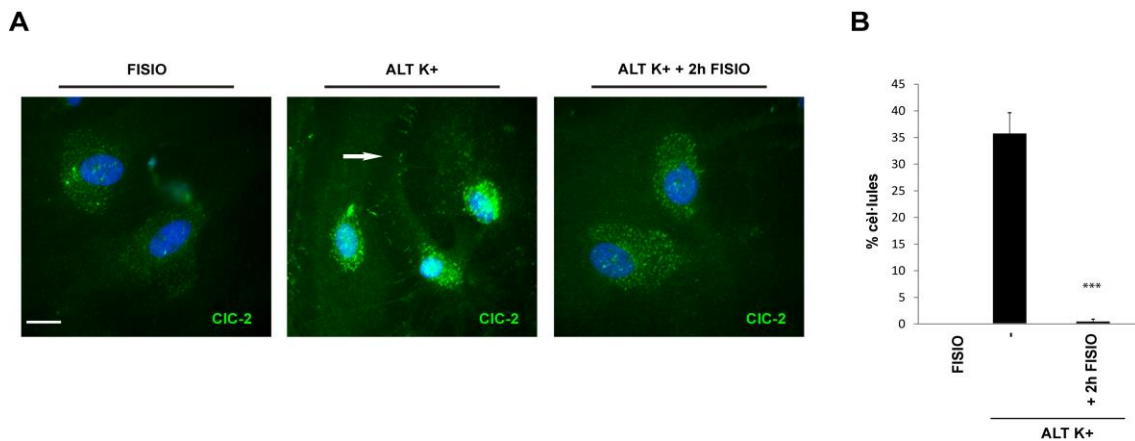


Figura 75. L'efecte del tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ en la localització de CIC-2 es reverteix amb el tractament d'un medi fisiològic. (A) Astròcits de rata tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ durant 6 hores i posteriorment tractats amb un medi fisiològic durant 2 hores. Es realitza una immunofluorescència per a detectar CIC-2 endogen utilitzant un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2. **(B)** Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten CIC-2 a la membrana cel·lular. Dades corresponents a 3 experiments independents, i el número de cèl·lules corresponents: FISO ($n=694$), ALT K^+ ($n=1059$), ALT K^+ + 2h FISO ($n=407$). *** $p<0.005$, t-Student *versus* el grup ALT K^+ . Barra: 20 μm .

2.2.6. Estudi d'altres elements involucrats en el tràfic de CIC-2 a la membrana sota condicions d'alta concentració de K^+ .

L'augment de K^+ extracel·lular provoca la despolarització de la cèl·lula amb la conseqüent activació de canals activats per voltatge positiu, com per exemple els canals de Ca^{2+} i Na^+ . A continuació ens vam preguntar si el flux de Ca^{2+} podia estar involucrat en el tràfic de CIC-2 a les unions astrocitàries a causa d'aquest augment del K^+ extracel·lular.

Per a estudiar la implicació del Ca^{2+} en aquest procés, es va recórrer a bloquejar la disponibilitat de Ca^{2+} intracel·lular de dues maneres. Primer de tot, es va realitzar un pre-tractament dels astròcits de rata amb Bapta-AM, un agent quelant de Ca^{2+} intracel·lular, durant 30 minuts a una concentració de 40 μM . Un cop realitzat el pre-tractament, es va incubar un grup d'astròcits amb un medi fisiològic i un altre grup amb un medi d'alta concentració de K^+ durant 6 hores. Es va observar que en aquells astròcits estimulats amb el medi d'alta concentració de K^+ , CIC-2 quedava retingut en l'espai citoplasmàtic incapaç d'arribar a la membrana cel·lular. Tot i això, hi havia un petit percentatge de cèl·lules (2%) on aquest efecte no es veia inhibir (**Figura 76 A i B**).

Els astròcits exhibeixen una forma d'activació i comunicació entre astròcits i neurones (a través d'unions *gap*) depenent de canvis en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} .

(Duffy and MacVicar, 1995) provocats per l'activitat sinàptica neuronal (Dani et al., 1992). Aquest augment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} és la condició necessària i suficient per a l'alliberament de glutamat per part de l'astròcit i modular així la transmissió sinàptica de les neurones adjacents (Araque et al., 1998; Kang et al., 1998). L'entrada de Ca^{2+} a l'interior de l'astròcit es pot donar per diferents canals de Ca^{2+} . Els canals de Ca^{2+} de tipus L, els quals requereixen grans despolaritzacions per a la seva activació, constitueixen la principal via d'entrada dels ions Ca^{2+} i contribueixen de forma significativa a controlar la secreció de neurotransmissors i els mecanismes d'excitació astrocitària (Lu et al., 2014).

Així doncs, a continuació es va inhibir l'entrada de Ca^{2+} bloquejant directament els canals de Ca^{2+} de tipus L mitjançant el tractament amb Nifedipina (Hofmann et al., 1999; McDonald et al., 1994). Per a realitzar aquest assaig, es van pre-tractar astròcits de rata amb un medi fisiològic suplementat amb Nifedipina a una concentració 30 μM durant 30 minuts i posteriorment es va tractar un grup d'astròcits amb un medi fisiològic i un altre grup amb un medi d'alta concentració de K^+ suplementat amb 30 μM de Nifedipina durant 6 hores. De la mateixa manera que es va observar amb el pre-tractament de Bapta-AM, bloquejant l'entrada de Ca^{2+} amb el tractament amb Nifedipina s'impossibilitava la localització de CIC-2 a la membrana plasmàtica (**Figura 76 A i B**).

Per mitjà d'estudis d'electrofisiologia es va observar que el tractament amb els diferents inhibidors provocava una disminució en l'índex d'activació del canal en el cultiu primari d'astròcits de rata sota condicions d'alta concentració de K^+ (**Figura 76 C**), tot i que aquest índex no es reduïa fins els nivells control. Aquesta disminució en l'índex d'activació de CIC-2 concorda amb els resultats obtinguts mitjançant els estudis d'immunofluorescència de CIC-2 (**Figura 76 B**).

Aquests resultats suggereixen que al bloquejar l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula o limitar la seva disponibilitat, s'ha alterat el mecanisme per el qual CIC-2 és dirigit a la membrana cel·lular.

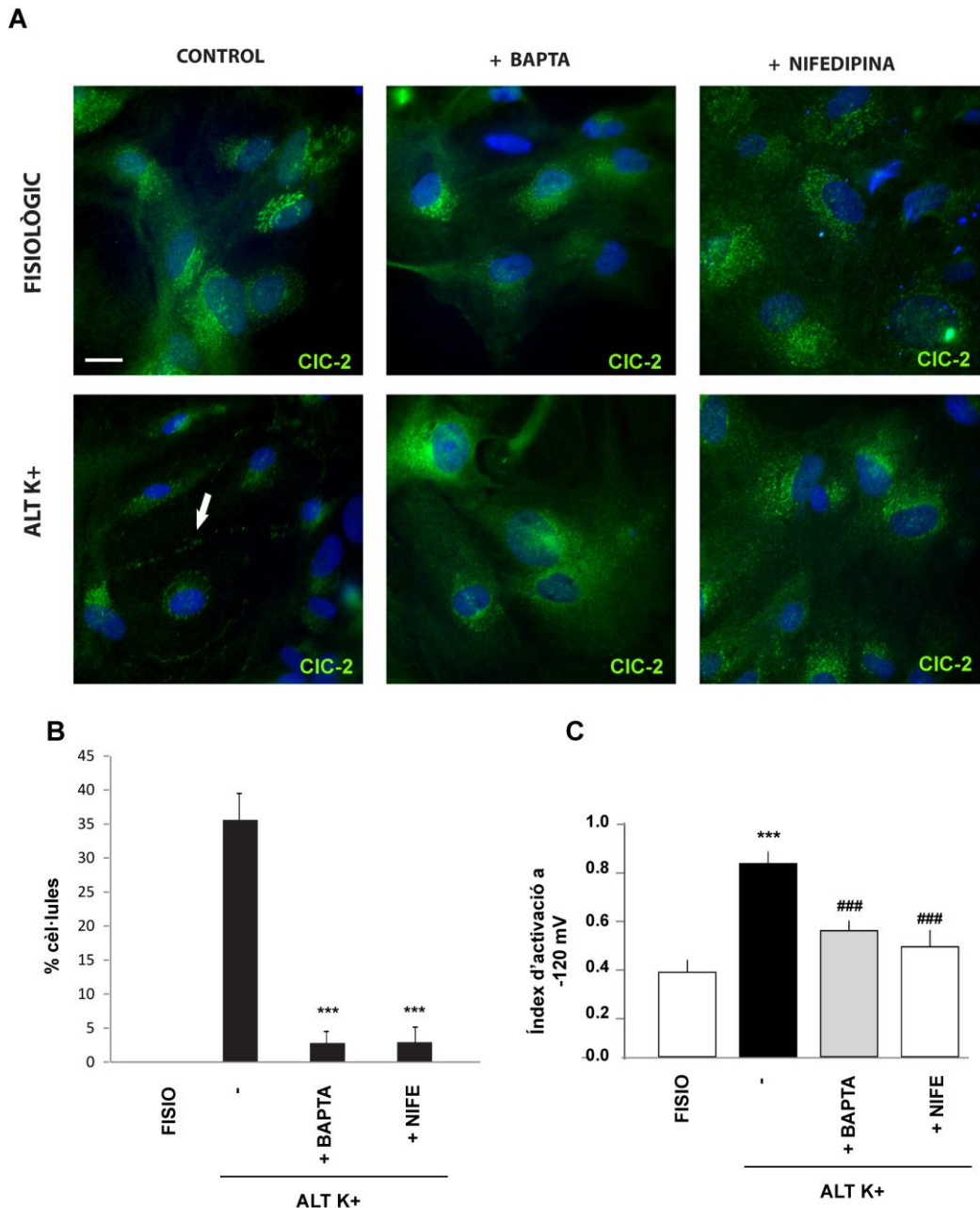


Figura 76. El bloqueig de calci intracel·lular provoca una inhibició de l'efecte de K^+ respecte la localització de CIC-2 a la membrana cel·lular en astròcits de rata. **(A)** Astròcits de rata van ser tractats amb Bapta-AM durant 30 minuts i posteriorment incubats amb un medi d'alta concentració de K^+ durant 6 hores (+ BAPTA AM) i astròcits de rata van ser tractats amb Nifedipina durant 30 minuts i posteriorment incubats amb un medi amb alta concentració de K^+ suplementat amb Nifedipina durant 6 hores. Es va realitzar un assaig d'immunofluorescència per a detectar CIC-2 endogen utilitzant un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de CIC-2. Barra: 20 μ m. **(B)** Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten CIC-2 a la membrana cel·lular. Dades corresponents a 3-5 experiments independents, i el número de cèl·lules corresponents: FISIO (n=694), ALT K^+ (n=1059), BAPTA AM (n=545) i NIFE (n=332). Test estadístic *t Student* no aparellat. *** $p < 0,005$ respecte ALT K^+ . **(C)** Mesura de l'índex d'activació de CIC-2 mitjançant estudis *Patch-Clamp*. Test estadístic *t Student* no aparellat. *** $p < 0,005$ respecte FISIO; ### $p < 0,005$ respecte ALT K^+ .

2.3. ANÀLISI DE GlialCAM i CIC-2 EN CONDICIONS D'ALTA CONCENTRACIÓ DE K^+ EN ASTRÒCITS DE RATOLÍ MLC1 *KNOCK-OUT*.

Resultats previs realitzats per una antiga membre del grup, la Dra. Sònia Sirisi, on es va caracteritzar el model de ratolí *knock-out* per MLC1 i les cèl·lules astrocitàries derivades d'aquest, mostraven com GlialCAM es trobava deslocalitzada en la glia de Bergmann però que aquesta deslocalització no s'observava en el cultiu d'astròcits derivats del model *knock-out* en condicions fisiològiques. Només s'observava la deslocalització de GlialCAM en el model *knock-out* de MLC1 quan aquests eren tractats amb un medi d'alta concentració de K^+ , recreant un episodi d'hiperactivitat neuronal (Sirisi et al., 2014). També es va observar que els nivells proteics de CIC-2 es trobaven disminuïts en el model *knock-out* de MLC1 i la seva localització en els oligodendròcits es trobava alterada (Hoegg-Beiler et al., 2014).

Atès que la manca de MLC1 provoca la deslocalització de GlialCAM i CIC-2 *in vivo* i que el tractament d'astròcits de rata amb un medi d'alta concentració de K^+ provocava un cert augment de GlialCAM en la membrana, modificava la localització de CIC-2 dirigint-la a la membrana i augmentava les corrents regulades per CIC-2 de manera similar a la sobreexpressió de GlialCAM *in vitro*, ens vam plantejar estudiar aquest efecte del K^+ en el cultiu primari d'astròcits derivats del model *knock-out* de MLC1.

2.3.1. Estudi bioquímic i funcional de CIC-2.

De la mateixa manera que s'havia dut a terme en astròcits de rata, la Dra. Sònia Sirisi va realitzar un tractament amb un medi fisiològic i amb un medi amb alta concentració de K^+ en els astròcits de ratolí *wild-type* o *knock-out* de MLC1. Els resultats obtinguts mostraven com els astròcits del ratolí *wild-type* en ambdues condicions i els astròcits del ratolí *knock-out* en condicions fisiològiques, presentaven GlialCAM a la membrana cel·lular. En canvi, quan els astròcits del ratolí *knock-out* eren tractats amb el medi d'alta concentració de K^+ , la proteïna es trobava deslocalitzada intracel·lularment (Sirisi et al., 2014). Aquests resultats indicaven que la presència de MLC1 en la membrana era indispensable per a l'estabilitat de GlialCAM quan hi havia un augment de K^+ extracel·lular.

Gràcies al model *knock-out* caracteritzat per la Dra Sònia Sirisi, es va poder estudiar si la manca de MLC1 alterava d'alguna manera el canvi de localització de CIC-2 generat pel tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ . De la mateixa manera que en els astròcits de rata, es van tractar astròcits *wild-type* i *knock-out* de ratolí en condicions fisiològiques i d'alta concentració de K^+ i posteriorment es va analitzar la localització de CIC-2.

En condicions fisiològiques, els astròcits *knock-out*, de la mateixa manera que en astròcits *wild-type*, presentaven CIC-2 localitzat intracel·lularment. La presència d'una alta concentració de K^+ en el cultiu d'astròcits *wild-type*, tal i com s'havia observat prèviament en els astròcits de rata, la proteïna CIC-2 modificava la seva localització concentrant-se a les unions cel·lulars. En canvi, el tractament amb el medi d'alta concentració de K^+ no provocava la modificació de la localització de CIC-2, incapaç d'arribar a la membrana cel·lular (**Figura 77**).

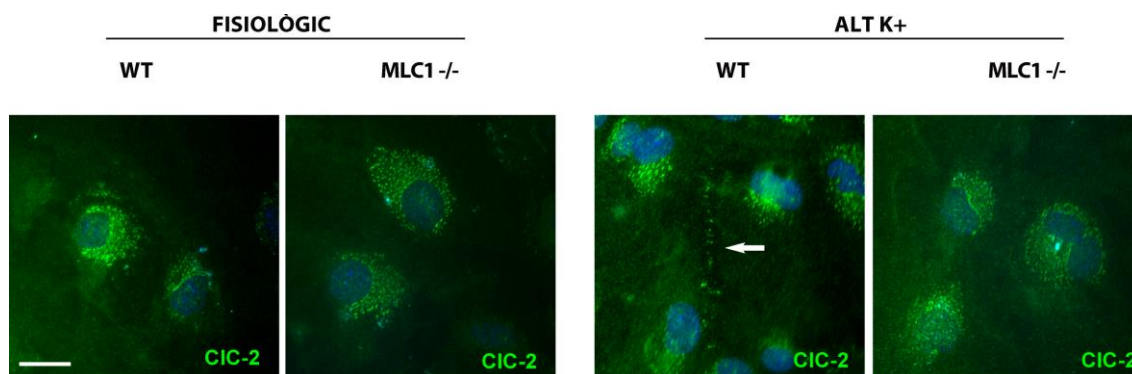


Figura 77. Estudi de la localització de CIC-2 en condicions d'alta concentració de K^+ en astròcits *knock-out*. Astròcits de ratolí *wild-type* (WT) i *knock-out* (MLC1 $-/-$) tractats en condicions fisiològiques i d'alta concentració de K^+ . Es detecta la proteïna CIC-2 endògena utilitzant un anticòs policlonal contra la part C-terminal de la proteïna. Les fletxes assenyalen la localització de CIC-2 a la membrana cel·lular. Dades corresponents a 2 experiments independents. Barra: 20 μ m.

En les mateixes condicions, es van realitzar experiments de *Patch-Clamp* en els astròcits de ratolí i es va observar que, de la mateixa manera que en astròcits de rata, el tractament amb un medi d'alta concentració de K^+ provocava un increment de les corrents de Cl^- regulades per CIC-2, mostrant les traces típiques a les obtingudes quan es sobreexpressava GlialCAM en condicions fisiològiques. En aquestes corrents també es va observar que el canal s'activava a potencials positius, presentant una menor rectificació (**Figura 78**).

Aquests resultats indicaven que la internalització de GlialCAM observada en els astròcits *knock-out* de MLC1 en presència d'altres concentracions de K^+ podria estar afectant directament la localització de CIC-2 en la membrana cel·lular i com a conseqüència la seva activitat com a canal.

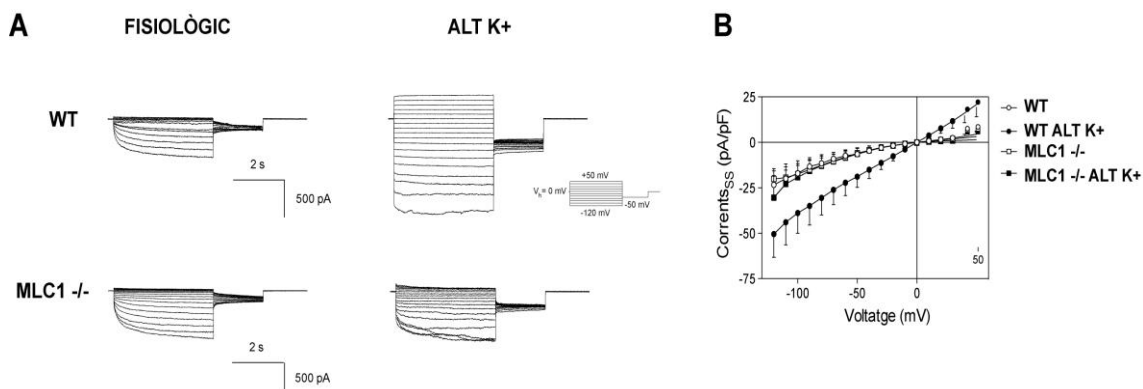


Figura 78. Mesura de l'activitat de CIC-2 en condicions d'alta concentració de K⁺ en astròcits *knock-out* de MLC1. (A) Registres representatius de les corrents de Cl⁻ detectades en astròcits de ratolí *wild-type* (WT) i *knock-out* per MLC1 (MLC1 -/-) diferenciats amb dAMPc. Es representa un registre típic de les corrents de Cl⁻ regulades pel canal CIC-2 en astròcits tractats durant 6 hores amb medi fisiològic o amb un medi d'alta concentració de K⁺ (60 mM). **(B)** Relació entre corrent i voltatge en estat d'equilibri (*steady state*).

2.4. ANÀLISI DE L'EFFECTE DE LES MUTACIONS EN GLIALCAM EN LA LOCALITZACIÓ DE CIC-2 EN CONDICIONS D'ALTA CONCENTRACIÓ DE K⁺.

Com s'ha mostrat en el primer capítol de resultats, hi havia 3 mutacions en GlialCAM que no veien afectada la seva estabilitat a la membrana per la manca de MLC1 sota condicions d'alta concentració de K⁺. Donat que no enteníem encara quin podia ser el defecte que presentaven els mutants K135Del, S196Y i D211N de GlialCAM associat a aquest anclatge a la membrana dels astròcits, i que resultats previs mostraven com la coexpressió d'aquestes variants mutades amb CIC-2 eren capaces de dirigir CIC-2 a les unions, ens vam plantejar estudiar el comportament d'aquests mutants en relació amb la proteïna CIC-2 endògena, sota condicions d'alta concentració de K⁺.

Per a dur a terme aquests experiments, es van infectar astròcits de ratolí amb els mutants de GlialCAM 48 hores abans del tractament. Passat el temps necessari per a que les cèl·lules expressessin 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 d'alta concentració de K⁺).

Es va observar que la sobreexpressió del mutant de GlialCAM S196Y encara mantenia certa capacitat en localitzar CIC-2 endogen a la membrana sota condicions d'alta concentració de K⁺, però en menor mesura que la proteïna *wild-type*. En canvi, la sobreexpressió dels mutants K135Del i D211N de GlialCAM provocava que CIC-2 fos incapaç d'arribar a la membrana cel·lular quan es realitzava el tractament amb un medi d'alta concentració de K⁺ (**Figura 79**). Aquests fets suggereixen que per als mutants

K135Del i D211N, el fet de mantenir-se en la membrana en condicions d'alta concentració de K^+ quan MLC1 no hi és present a la cèl·lula no significaria un guany de funció per a la proteïna GlialCAM sinó que segurament la formació del complex GlialCAM/CIC-2 no seria possible i per tant GlialCAM no podria estabilitzar CIC-2 a les unions cel·lulars.

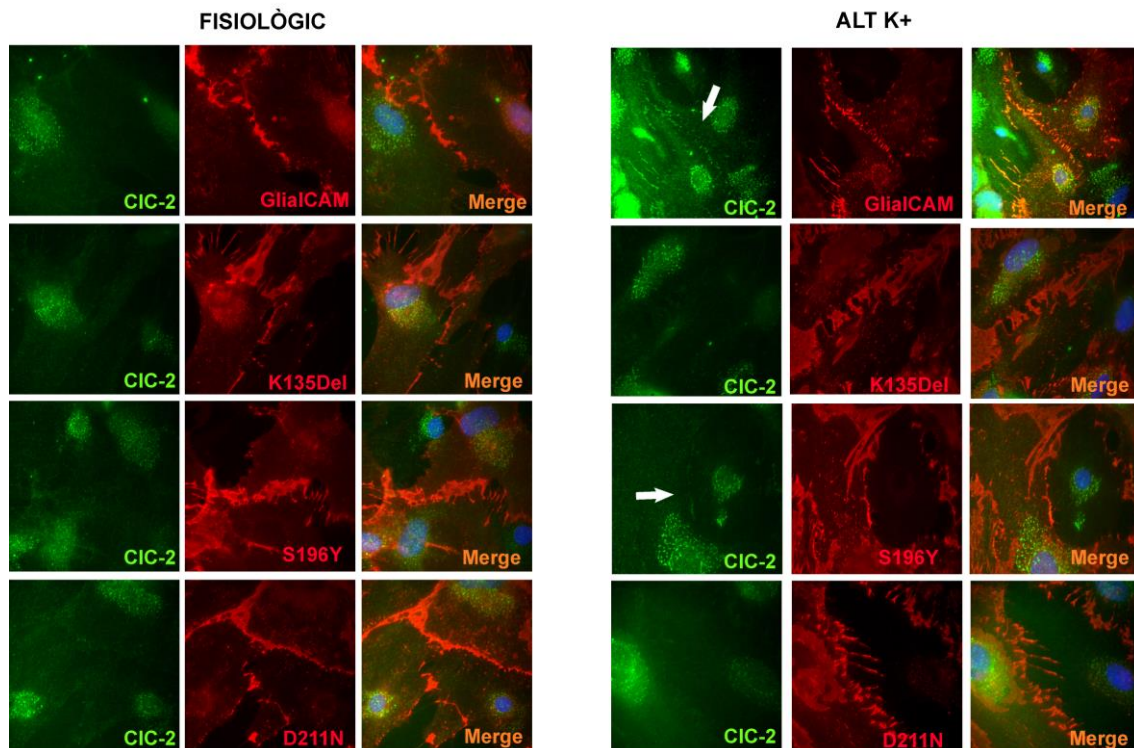


Figura 79. Estudi de la localització de CIC-2 en astròcits de ratolí infectats amb proteïnes defectives de GlialCAM. Astròcits infectats amb adenovirus de sobreexpressió de GlialCAM-Flag *wild-type* o les variants mutades K135Del, S196Y i D211N. Es detecta GlialCAM utilitzant un anticòs contra l'epítip Flag fusionat a la proteïna (vermell) i un anticòs policlonal contra l'extrem C-terminal de la proteïna endògena CIC-2. Les fletxes assenyalen la localització de CIC-2 en la membrana. Dades corresponents a 3 experiments individuals.

Aquestes mutacions s'han estudiat també en astròcits de rata i s'ha obtingut els mateixos resultats (dades no mostrades). Tot i així, aquests resultats són preliminars i requereixen de més experiments per poder extreure algun resultat concloent. Seria interessant realitzar estudis electrofisiològics sobreexpressant aquests mutants sota condicions d'alta concentració de K^+ , i així avaluar si hi ha alguna alteració en la funció del canal CIC-2.