



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 CIC-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

INTRODUCCIÓ

L'objectiu de la present Tesi és avançar en el coneixement de la fisiopatologia de les leucodistròfies neurodegeneratives que causen vacuolització de la mielina i en especial, la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals.

En aquest apartat d'introducció primer s'introdueix, de forma general, la classificació existent de les leucodistròfies, el context on es desenvolupa la nostra malaltia d'estudi i s'aprofundeix en els aspectes clínics i moleculars de la malaltia. En segon lloc, es tractarà el canal de clorur CIC-2 i les seves funcions associades al sistema nerviós. Per últim, es descriu el paper dels astròcits en el sistema nerviós central, ja que són principalment les cèl·lules implicades en la malaltia d'estudi i on s'ha realitzat la majoria d'experiments.

1. MALALTIES GENÈTIQUES ASSOCIADES A DEFECTES EN LA MIELINA: LES LEUCODISTRÒFIES.

La mielina desenvolupa un paper important en la ràpida transmissió de l'impuls nerviós. Existeix un ampli ventall de malalties provocades per un defecte en la generació de la mielina o bé per un defecte en el desenvolupament de la mateixa. D'entre aquestes malalties destaquen les leucodistròfies, un grup de malalties genètiques del sistema nerviós on la generació, el desenvolupament i/o el manteniment de la mielina es veuen afectats.

1.1. GENERALITATS DEL SISTEMA NERVIÓS.

El sistema nerviós dirigeix una gran quantitat de processos com són el funcionament dels òrgans interns, la memòria, el pensament i l'aprenentatge, així com els processos voluntaris i involuntaris de l'organisme. El sistema nerviós es classifica en Sistema Nerviós Central (SNC), format per l'encèfal (cervell, cerebel i bulb raquídic) i la medul·la espinal; i el Sistema Nerviós Perifèric (SNP), format pels nervis cranials i els nervis perifèrics que parteixen de la medul·la i les seves ramificacions.

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

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

accions que requereixen una despesa energètica; i el Sistema Parasimpàtic, encarregat d'emmagatzemar energia.

1.1.1. Cèl·lules del teixit nerviós.

Tot el teixit nerviós, tant el central com el perifèric, està constituït per cèl·lules altament especialitzades, majoritàriament per dos classes cel·lulars: les neurones i les cèl·lules glials.

Les neurones són les responsables de transmetre els impulsos nerviosos. Aquesta transmissió es realitza mitjançant els processos que tenen les neurones, anomenats dendrites. Les dendrites reben, integren i transmeten els impulsos elèctrics (potencials sinàptics) procedents de cèl·lules veïnes.

Les cèl·lules glials es poden dividir en dos tipus: la microglia i la macroglia. La microglia està formada per un conjunt de cèl·lules petites i la macroglia està formada majoritàriament per astròcits i també per cèl·lules endodials i oligodendròcits.

La microglia està formada per cèl·lules petites amb un cos dens i allargat, i unes prolongacions allargades. S'originen durant el desenvolupament a partir de precursors mesenquimals que penetren en la parènquima cerebral. Quan, a causa d'una infecció o d'un trauma, apareixen en el medi productes de secreció com citoquines, aminoàcids excitatoris o radicals lliures, la microglia s'activa expressant una gran varietat d'antígens, constituint el sistema de defensa i reparació del SNC. La microglia compleix funcions importants no només relacionades amb l'eliminació de residus o en la resposta immune; també juguen un paper important durant el desenvolupament en la inducció de mort cel·lular controlada en certes regions.

Les cèl·lules endodials constitueixen l'epiteli cerebral, revestint les cavitats de l'encèfal i el conducte central de la medul·la espinal. Es troben interconnectades per unions adherents, unions *gap* i unions *tight* formant la barrera hematoencefàlica. Juntament amb la musculatura llisa, els astròcits i les neurones perivasculars constitueixen la unitat neurovascular amb l'objectiu de proporcionar defenses, proveir el cervell d'energia i mantenir l'homeòstasi del microentorn cerebral.

Els astròcits tenen una funció estructural, reparadora i de nutrició de les neurones. Actuen com a suport d'unió entre neurones; quan una neurona es mor, els astròcits es divideixen i omplen l'espai buit. A més a més, mitjançant l'emissió d'unes prolongacions que arriben fins als capil·lars sanguinis, capten els nutrients per nodrir les neurones.

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

La mielina està constituïda per una estructura espiral formada per la prolongació de la membrana plasmàtica dels oligodendròcits en el SNC, i de les cèl·lules de Schwann en el cas del SNP. La superposició de la membrana plasmàtica, que envolta l'axó, forma una estructura periòdica de capes concèntriques alternades. Aquestes capes són electrodenses (membranes fusionades) i clares o línies interperiòdiques (fusió de l'espai extracel·lular), les quals formen una estructura laminar compacta que genera la mielina madura.

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

Els axons mielinitzats constitueixen la substància blanca, la qual ocupa més de la meitat del cervell humà. S'ha observat que tant les mutacions en els gens relacionats amb la mielina, com els canvis en l'estructura de la substància blanca, causen una gran varietat de trastorns neurològics i psiquiàtrics.

1.2. CLASSIFICACIÓ DE LES LEUCODISTRÒFIES.

La paraula leucodistròfia prové de les arrels gregues "*leuco*" (blanc), "*dis*" (discapacitat) i "*trophos*" (creixement); per tant, les leucodistròfies són un conjunt de trastorns d'origen genètic que afecten la mielina, excloent malalties inflamatòries i autoimmunes (com per exemple l'esclerosi múltiple), o d'origen ambiental com són les causades per l'exposició a dissolvents orgànics. Les leucodistròfies que impliquen el SNC es denominen leucoencefalopaties.

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

Taula 1. Classificació de les leucodistròfies. Taula resum on es mostra les leucodistròfies agrupades en funció del defecte que mostren i on s'especifica el gen involucrat en el desenvolupament de la malaltia.

Fins al moment, s'havia classificat les leucoencefalopaties en funció d'un criteri patològic o bioquímic. Recentment, gràcies als nous coneixements d'aquest tipus de malalties, els experts han generat una nova classificació segons el defecte que pateixen (**Taula 1**). Les leucoencefalopaties peroxisomals es caracteritzen per un funcionament incorrecte dels enzims del peroxisoma, estructura cel·lular encarregada

de la desintoxicació de la cèl·lula, particularment de la degradació dels àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFAs). Les leucoencefalopaties lisosomals, per altra banda, es caracteritzen per una degradació o transport de macromolècules defectiva a causa d'una deficiència dels enzims lisosomals o proteïnes associades. Un altre grup de leucoencefalopaties, les vacuolitzants, són les caracteritzades per una alteració de la substància blanca cerebral presentant inflamament i vacuolització. A diferència d'aquest grup, les leucoencefalopaties hipomielinitzants es caracteritzen per un dèficit permanent de la mielina en el cervell. Per últim, trobem les leucoencefalopaties no classificades o indeterminades en les quals el gen responsable encara no està identificat, i les leucoencefalopaties atípiques, les quals no es podrien englobar en cap dels subtipus anteriors.

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

Les leucodistròfies acostumen a aparèixer els primers anys de vida donat que el pic màxim de la mielinització es produeix durant els dos primers, tot i que el procés no es completa fins arribar a l'adolescència. La formació de la mielina i el seu manteniment requereix el correcte funcionament conjunt d'oligodendròcits, astròcits i neurones. S'ha associat els astròcits amb el manteniment de la substància blanca (Liedtke et al., 1996) i es troben afectats directament en algunes leucodistròfies com la leucoencefalopatia VWM, la malaltia d'Alexander (Sen and Levison, 2006) i MLC (López-Hernández et al., 2011a).

1.3. LA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS: MLC.

L'any 1991, un neuròleg va presentar les característiques clíniques d'un determinat nombre de pacients locals, que pertanyien a un grup determinat del nord de l'Índia, coneguts com els Agarwals (Singhal, 1991). Aquests pacients mostraven signes de megalencefalia, un lleuger retard mental i espasticitat progressiva. No es va observar anomalies a nivell metabòlic. Els estudis de neuroimatge mostraven signes evidents corresponents a un trastorn de la substància blanca, amb la característica que presentaven quists majoritàriament a nivell subcortical. Degut al tipus de transmissió genètica, es va proposar que aquesta malaltia presentava un patró d'herència autosòmica recessiva.

Des del seu descobriment, la malaltia ha anat adoptant diferents nomenclatures, fins que la major part dels investigadors implicats en el camp van consensuar la denominació MLC, com acrònim per Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals.

1.3.1. Característiques clíniques de la malaltia.

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

Actualment, els criteris principals per al diagnòstic són:

- 1) Macrocefàlia durant els primers anys de vida. Posteriorment, el creixement del crani resulta generalment normal, arribant a una línia paral·lela al percentil 98.
- 2) En alguns casos no s'observa deteriorament neurològic. Si hi és present, aquest acostuma a ser lent.
- 3) Encèfal atrofiat i inflat. Es mostra la substància blanca anormalment difosa (**Figura 1**).
- 4) En estructures centrals, com són el cos callós, la càpsula interna i el tronc cerebral, la substància blanca es troba més conservada tot i que la seva integritat no és total. També s'observa aquesta preservació en les regions subcorticals i preentriculars de la zona occipital del cervell.
- 5) Presència de quists subcorticals en la regió anterior-temporal.
- 6) La substància gris es manté intacta sense mostrar cap tipus d'anormalitat.
- 7) Al llarg del desenvolupament de la malaltia hi ha presència d'atròfia cerebral continua en alguns casos i en altres es pot arribar a normalitzar.
- 8) Deteriorament de les funcions motores i atàxia cerebelar juntament amb espasticitat durant la infància més tardana i l'adolescència. La capacitat per caminar és limitada i inestable. La majoria dels pacients acaben necessitant cadira de rodes.

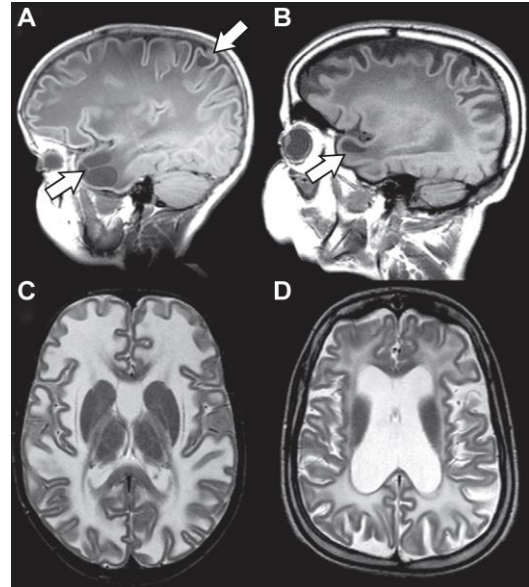


Figura 1. Imatges de MRI corresponents a pacients de MLC. Imatges de MRI en vista sagital (A i B) i axial (C i D) de dos pacients amb MLC a les edats de 6 (A i C) i 30 anys (B i D). S'observa la presència de quists a nivell fronto-parietal i anterior-temporal (fletxes). En les vistes axials (C i D) s'observa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

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

Per mitjà de l'anàlisi dels resultats obtinguts utilitzant tècniques d'espectroscòpia per ressonància magnètica de protons es va observar una disminució en la concentració de la majoria de metabòlits en els pacients amb MLC. Aquest fet suggereix que hi ha una acumulació d'aigua en el cervell (Brockmann et al., 2003; Sener, 2003a, 2003b).

Estudis histopatològics a partir de la biòpsia d'una pacient van mostrar una degeneració espongiforme de la substància blanca i la presència de vacuoles a les capes més externes de la mielina, mantenint intactes les capes més internes (van der Knaap et al., 1996) (**Figura 2**). La majoria de les vacuoles es troben envoltades per una única membrana de mielina, encara que algunes es poden trobar envoltades per estructures multilaminars de mielina o per prolongacions cel·lulars dels oligodendròcits. El fet que les vacuoles només es trobin en les capes més externes de la mielina fa pensar que no es compromet en excés la transmissió de l'impuls nerviós, fet que podria explicar que el fenotip clínic de la malaltia sigui progressiu i no mortal durant els primers anys de vida.

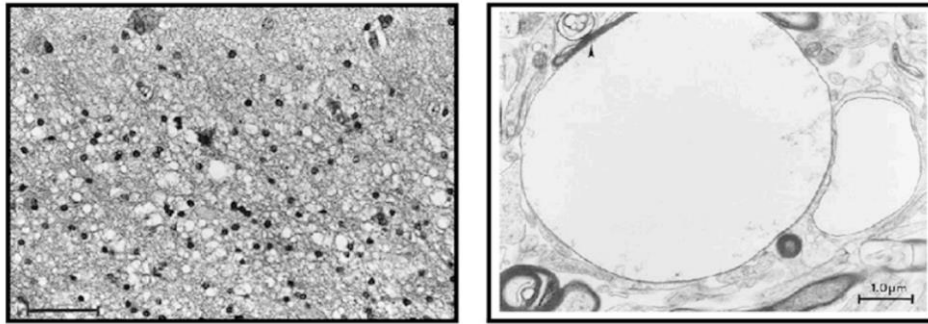


Figura 2. Microfotografies que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca d'un pacient amb MLC. La imatge de la dreta representa una vacuola observada en les làmines més externes de la mielina (van der Knaap et al., 1996).

L'any 2010 es va realitzar un estudi en un grup de 160 pacients afectats per la MLC dels quals 54 pacients no presentaven mutacions en el gen *MLC*. Mitjançant MRI es va observar que alguns pacients presentaven característiques fenotípiques diferents (van der Knaap et al., 2010). Tot i manifestar el quadre clínic de MLC els primers anys de vida, aquest anava millorant amb el temps. Aquests pacients presentaven macrocefàlia els primers anys de vida i amb les funcions motores normals sense espasticitat ni atàxia. Els pacients amb aquest fenotip no mostraven retard mental i en el cas que en presentessin, acostumava a ser de baix grau on no es necessitava educació especial. En un 50% d'aquests pacients amb dèficit cognitiu s'observava símptomes d'autisme (López-Hernández et al., 2011a). En les imatges de MRI s'observava que la substància blanca del cervell i cerebel presentava menor anormalitat en els estadis inicials i evolucionava favorablement al llarg del temps obtenint imatges de la substància blanca típicament normals. A més a més, els quists subcorticals únicament s'observaven en la regió anterior-temporal i disminuïen de mida o desapareixien amb el temps (**Figura 3**). Aquest tipus de fenotip on es reverteixen els signes de deteriorament s'anomena fenotip benigne.

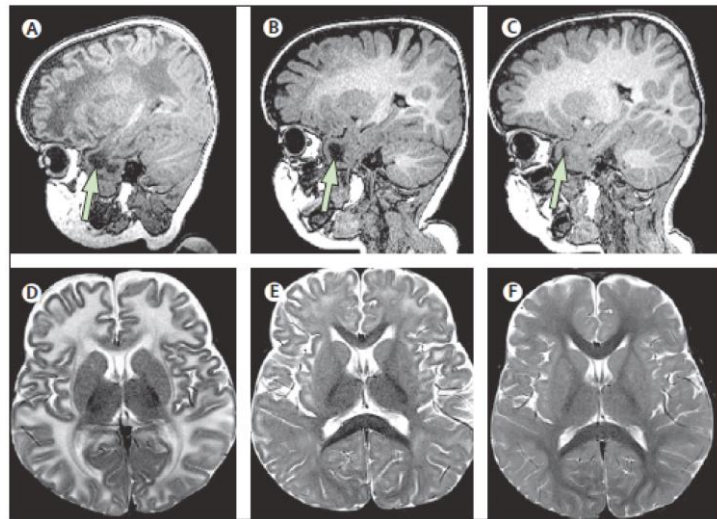


Figura 3. Imatges de MRI corresponents a un pacient afectat per MLC amb fenotip benigne. MRI corresponents a un pacient afectat per MLC amb fenotip benigne a les edats de 9 mesos (A i D), 18 mesos (B i E) i 42 mesos (C i F). En A i D s'observen les característiques típiques de MLC, en canvi, en B-E i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

Així doncs, els pacients es classifiquen segons tinguin un fenotip clàssic o benigne. El fenotip clàssic s'ha anomenat MLC o MLC2A en funció del tipus de gen afectat i presenta les característiques clíniques típiques de MLC. El fenotip benigne on hi ha remissió de les característiques clíniques, s'ha anomenat MLC2B. Recentment, però, s'ha descrit que extraordinàriament algun pacient que presenta el fenotip clàssic, és a dir que manifesta el fenotip MLC1 o MLC2A, mostra una millora a partir de les imatges de MRI però sense presentar una millora clínica (Arnedo et al., 2014a; van der Knaap et al., 2012).

El fet que MLC sigui una malaltia extremadament rara provoca que fins al dia d'avui encara no existeixin estudis sobre la seva incidència. Es coneix que la màxima incidència s'ha observat en la població turca (Yiş et al. 2010) i en la comunitat índia dels Argwals (Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 1996). La consanguinitat i l'endogàmia són factors importants en l'aparició de malalties rares. Els països àrabs acostumen a tenir un major nombre de matrimonis consanguinis. Recentment s'ha descrit 6 pacient afectats per la MLC en diferents regions d'Egipte (Mahmoud et al., 2014) i 18 pacients a l'Iran (Kariminejad et al., 2014); anteriorment ja se n'havien descrit en altres països com Marroc, Líbia i Tunísia (Koussa et al., 2005; Tinsa et al., 2009).

1.3.2. Genètica de la malaltia.

A partir d'estudis de lligament realitzats en famílies corresponents a una població turca es va trobar un *locus* per a MLC en el cromosoma 22qtel (Topcu et al., 1998). En estudis posteriors, es va reduir la regió crítica implicada gràcies a marcadors microsatèl·lits i recombinants, observant mutacions en un gen denominat *KIAA0027* o *WKL1* [MIM #604004]. Aquest gen va ser renombrat com *MLC1* ja que era el primer gen implicat en la malaltia (Leegwater et al., 2002).

El gen *MLC1* s'estén al llarg de 26 kb en el cromosoma 22qtel. Aquest gen conté 12 exons dels quals el primer no és codificant, situant-se així el codó d'inici en l'exó 2. S'ha descrit dos transcrits alternatius (NM_015166.3 i NM_139292.2) que difereixen en la regió 5' corresponents al primer exó, però que resulten en un mateix mRNA i codifiquen per la proteïna MLC1 de 377 aminoàcids.

Fins al moment hi ha descrites 87 mutacions per al gen *MLC1* dels quals 45 són *missense*, 16 són mutacions d'*splicing*, 15 són delecions, 6 són duplicacions, 4 són inserció+deleció i 1 és *nonsense* (van der Knaap et al., 2012). Aquestes mutacions es troben repartides per tot el gen i s'han trobat tant en homozigosi com en heterozigosi.

La variabilitat fenotípica intrafamiliar observada en pacients que porten la mateixa mutació en *MLC1* indica que hi ha factors genètics i ambientals que estarien influenciant en la severitat de la malaltia (Pascual-Castroviejo et al., 2005). Per tant, no s'ha pogut trobar una correlació genotip-fenotip (Duarri et al., 2008) ja que la severitat del fenotip dels pacients no es correlaciona amb les mutacions trobades.

Només un 80% dels pacients afectats per MLC presentaven mutacions en el gen *MLC1* (Leegwater et al., 2001, 2002; Patrono et al., 2003; Topcu et al., 1998). La majoria dels pacients que no presentaven mutacions en aquest gen tampoc presentaven lligament amb el seu *locus* però sí que presentaven les mateixes característiques clíniques de MLC (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003). Així doncs, el fet que no tots els pacients presentessin mutacions en *MLC1* i que s'haguessin descrit dos tipus de fenotips diferents per a la malaltia MLC suggeria l'existència d'heterogeneïtat genètica.

L'any 2010, en col·laboració amb l'empresa *Logopharm*, el nostre grup va realitzar estudis de proteòmica per tal d'intentar identificar proteïnes que interaccionessin amb *MLC1*. A partir d'aquests estudis es va obtenir un llistat de proteïnes candidates a formar part de l'interactoma de *MLC1*. Les proteïnes candidates escollides es van classificar en 2 grups diferents: proteïnes típiques d'unions cel·lulars, ja que *MLC1* es

localitza en unións astrocitàries (Duarri et al., 2011) i proteïnes amb funció de canal iònic o transportador, ja que el fenotip vacuolitzant que presenten els pacients afectats per MLC suggeria que MLC1 podria formar part d'algun complex mediador de la translocació d'ions a través de la membrana cel·lular. Aquestes proteïnes candidates també es van estudiar en el laboratori mitjançant estudis bioquímics d'interacció i colocalització amb MLC1. Aquests estudis van mostrar una interacció directe entre MLC1 i GlialCAM.

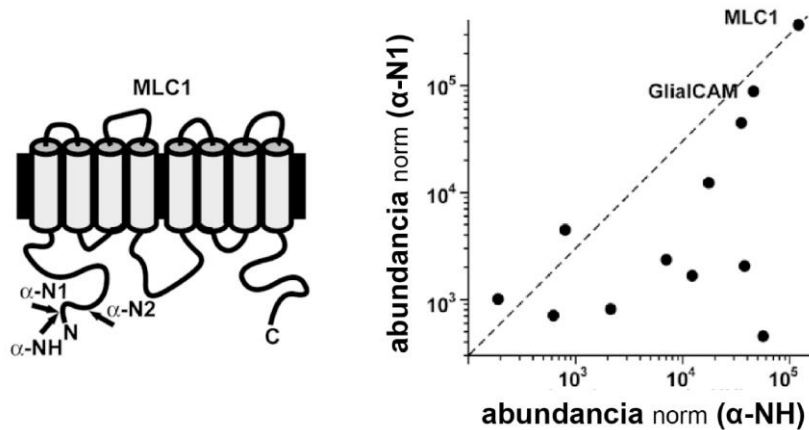


Figura 4. Anàlisi de les diferents purificacions per afinitat realitzades contra la proteïna MLC1 en col·laboració amb Logopharm. Gràfic 2D de les diferents abundàncies de proteïnes determinades per espectrometria de masses després de la coimmunoprecipitació de membranes de cervell de rata i ratolí utilitzant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

Paral·lelament a aquests estudis, la Dra. Marjo van der Knaap va realitzar estudis d'alguns gens candidats (obtinguts en la llista de proteòmica) en pacients que no presentaven mutacions en *MLC1*. En aquests pacients, es va observar mutacions en *GLIALCAM*. Així doncs, es va descriure *GLIALCAM* com el segon gen implicat en la malaltia MLC (López-Hernández et al., 2011a).

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

Fins al moment, s'ha descrit 19 mutacions diferents en *GLIALCAM*. D'aquestes mutacions, 11 són *missense*, 2 són *deleccions*, 1 és una *delecció+inserció* i 2 són *nonsense* (Arnedo et al., 2014a; van der Knaap et al., 2012). S'ha descrit que les mutacions en *GLIALCAM* provoquen l'aparició dels diferents fenotips de MLC, MLC2A o MLC2B. El fenotip MLC2A segueix un patró d'herència autosòmica recessiva i els pacients que el presenten mostren un fenotip clàssic de MLC. En canvi, el fenotip MLC2B, segueix un patró d'herència autosòmica dominant i els pacients que el

presenten mostren una millora amb el temps (van der Knaap et al., 2010; López-Hernández et al., 2011a).

1.3.3. Proteïna MLC1.

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

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

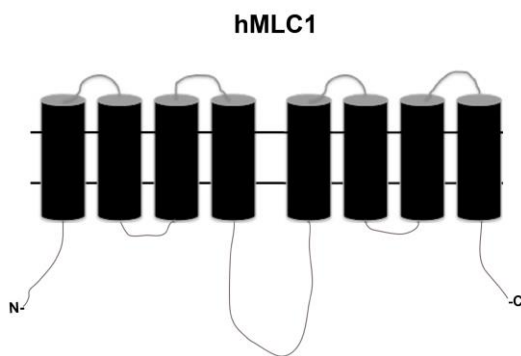


Figura 5. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1 humana segons prediccions bioinformàtiques. Es mostren els 8 segments transmembrana, els 4 *loops* extracel·lulars, els 3 *loops* intracel·lulars i els extrems C-terminal i N-terminal.

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

Realitzant estudis d'alineament entre seqüències de diferents ortòlegs de MLC1 en mamífers, aus i peixos s'ha observat que els dominis transmembrana i la regió distal de l'extrem C-terminal es troben altament conservats, principalment entre ratolí, rata i humà. Aquest fet suggereix que aquests dominis han de tenir una funció important. En canvi, la regió N-terminal difereix molt entre les diferents espècies estudiades.

1.3.3.1. Expressió i localització de MLC1.

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

La proteïna MLC1 es localitza principalment en la glia de Bergmann, en el cerebel i en astròcits localitzats al voltant de les regions subpial i perivascular. MLC1 no està present ni en oligodendròcits ni en la microglia. S'havia descrit prèviament que MLC1 s'expressava en neurones (Teijido et al., 2004, 2007), però estudis de marcatge en el ratolí *knock-out* de MLC1 han mostrat que el marcatge observat era inespecífic (Hoegg-Beiler et al., 2014). Estudis de microscòpia electrònica d'alta resolució (*immunogold*) realitzats en teixit de ratolí i en teixit humà han demostrat que MLC1 es troba localitzada en unions astrocitàries perivasculars i no en unions entre astròcits i cèl·lula endotelial (Duarri et al., 2011; Teijido et al., 2007).

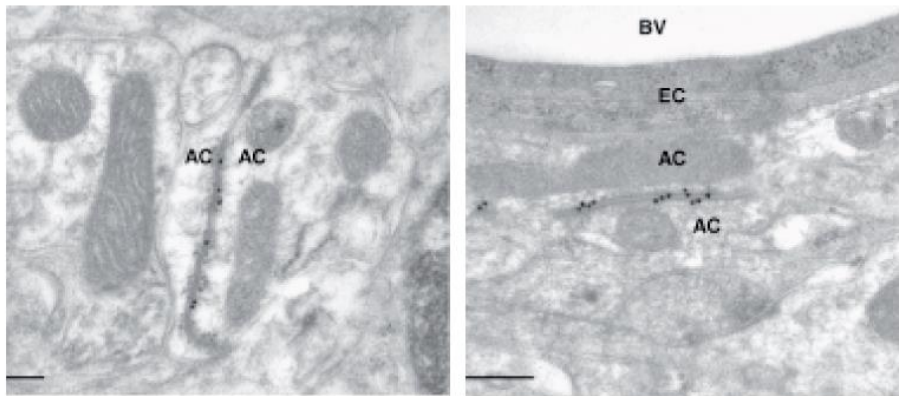


Figura 6. Localització de MLC1 mitjançant microscòpia electrònica. S'observa la proteïna MLC1 localitzada en les unions astrocitàries, tant en zones perivasculars com en els processos astroglials, però no en unions de contacte directe amb la làmina basal del vas sanguini. AC: astròcit; EC: cèl·lula endotelial;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

Diferents estudis de fraccionament bioquímic, coimmunoprecipitació i microscòpia confocal feien hipotetitzar que MLC1 podia trobar-se associada al complex DGC (*dystrophin-glicoprotein*) ja que s'havia observat colocalització de MLC1 i algunes de les proteïnes d'aquest complex en els peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007). La desestabilització d'aquest complex pot provocar canvis en la polaritat glial, alteracions de la barrera hematoencefàlica i alteracions en l'homeòstasi d'ions i d'aigua en el cervell (Warth et al., 2005). Estudis del grup realitzats a partir d'*immunogold* en teixit humà, van mostrar que MLC1 i β -dístroglicà (proteïna localitzada en la membrana astrocitària en contacte amb la làmina basal que forma part del DGC) no colocalitzen, concloent que MLC1 no forma part del complex DGC (Duarri et al., 2011).

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

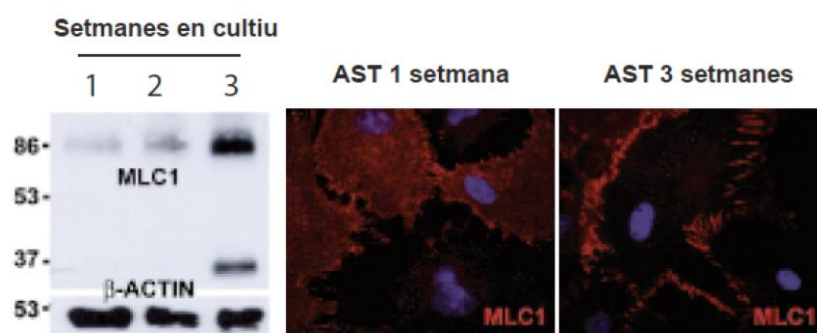


Figura 7. Model cel·lular astrocitari. Expressió de MLC1 analitzada per WB en astròcits diferenciats a 1,2 i 3 setmanes de cultiu. Localització de MLC1 mitjançant immunofluorescència en astròcits en cultiu d'1 i 3 setmanes (Duarri et al., 2011).

Aquest model astrocitari ha sigut utilitzat com a model de la malaltia ja que reproduceix la mateixa localització de MLC1 *in vivo*. A partir d'aquest model, s'ha descrit que MLC1 colocalitza amb proteïnes components de les unions *tight*, com ZO-1 (*zonula occludens*) i Ocludina, i també amb proteïnes de les unions adherents com per exemple β-Catenina i N-Cadherina (Duarri et al., 2011).

1.3.3.2. Estructura i funció de la proteïna MLC1.

La proteïna MLC1 presenta regions d'homologia interna (Teijido et al., 2004) on els dominis transmembrana de la primera meitat de la proteïna mostren homologia amb la segona meitat. Aquesta homologia entre les dues meitats es mostra de manera més evident entre els dominis transmembrana 4 i 8, ja que es caracteritzen per un conjunt de residus leucina.

Existeixen evidències bioquímiques que suggereixen que MLC1 forma homo-oligòmers ja que la detecció de la proteïna per *western blot* (WB) reconeix principalment dues bandes amb un pes aproximat de 37 kDa i 70 kDa que probablement correspon a les formes monomèriques i dimèriques de la proteïna. Mitjançant estudis d'interacció s'ha

observat que MLC1 oligomeritza amb ella mateixa i que aquesta unió no depèn de ponts disulfur. A més, la proteïna presenta un lloc putatiu de glicosilació (NPS) entre els segments 3 i 4, però s'ha comprovat que no es troba glicosilada (Teijido et al., 2004).

Per altra banda, estudis bioquímics utilitzant proteïnes de fusió que contenen els extrems N-terminal i C-terminal de MLC1, indiquen que els dos extrems són fosforilats per la quinasa A/C en el residu Serina 27 i per la quinasa C en el residu Serina 339. El tractament amb activadors d'aquestes quinases incrementa la presència d'una banda de 60 kDa, la qual s'ha suggerit que representa a MLC1 associat a la membrana plasmàtica i que augmenta la presència de la proteïna en els processos astrocitaris (Lanciotti et al., 2010). No obstant, encara es desconeix si aquests residus estan directament involucrats en aquest efecte ja que no s'han realitzat estudis de mutagènesi eliminant aquests dos residus.

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

En estudis realitzats a partir de la biòpsia del cervell d'un pacient afectat per MLC només s'havia observat vacuoles a nivell de la mielina (van der Knaap et al., 1996) però donat que posteriorment s'ha descrit que la manca de MLC1 en astròcits provoca vacuolització intracel·lular (Duarri et al., 2011) es va reexaminar la mateixa biòpsia i es va observar vacuoles en astròcits de la zona perivascular (**Figura 8**).

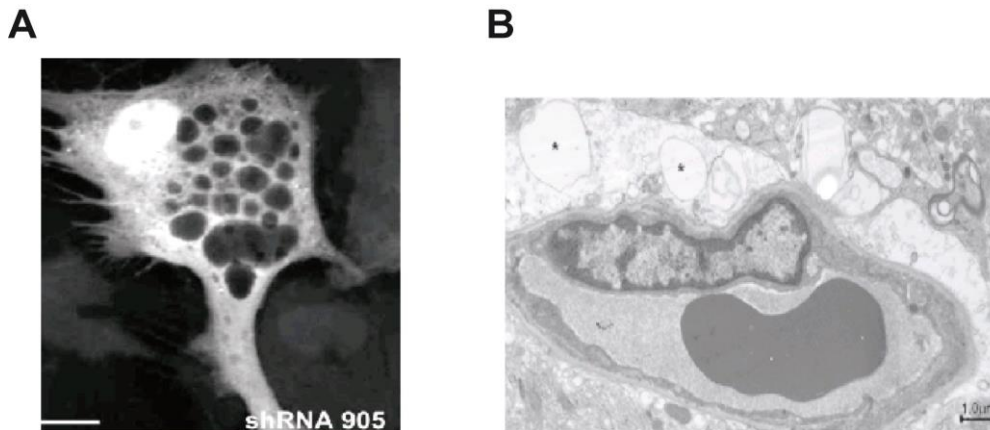


Figura 8. Vacuolització astrocitària. (A) Astròcits deplecionats de MLC1 mitjançant la infecció amb adenovirus que expressen miRNA MLC1 (shRNA 905). S'observa una gran quantitat de vacuoles citoplasmàtiques. (B) Imatges de microscòpia electrònica del cervell d'un pacient afectat per MLC. Es mostra la presència de vacuoles en els astròcits perivasculars (Duarri et al., 2011).

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

La disminució de l'activitat VRAC és el primer defecte funcional descrit en la malaltia MLC. VRAC és responsable del flux d'osmòlits de clorur davant d'un xoc osmòtic (Ernest et al., 2005). Aquest flux d'ions i osmòlits va acompanyat d'un flux d'aigua en un procés anomenat *Regulatory Volume Decrease* (RVD) (Pasantés-Morales et al., 2006). Podria ser que en absència de MLC1, els astròcits no puguin eliminar tota l'aigua emmagatzemada ja que mostren una activitat VRAC disminuïda i una activitat RVD més lenta, i s'emmagatzemi en forma de vacuoles intracel·lulars. No obstant, la relació bioquímica entre MLC1 i VRAC roman desconeguda.

Estudis de doble híbrid van descriure que MLC1 interacciona amb la subunitat β -1 de la bomba Na^+/K^+ ATPasa i per tant, podria formar part del complex macromolecular associat al canal de potassi Kir4.1, caveolina-1, sintrofina, aquoporina-4, Na^+/K^+ ATPasa i TRPV4. Aquests resultats indicaven que MLC1 està involucrat en la resposta dels astròcits als canvis de la composició d'ions extracel·lulars i que coopera amb

TRPV4 en l'activació de l'entrada de calci en condicions d'estrès hipoosmòtic. TRPV4 és un canal de calci que actua com a sensor i en condicions hipoosmòtiques fa augmentar la concentració de calci intracel·lular, essent essencial per l'activació del mecanisme RVD (Benfenati et al., 2011; Brignone et al., 2011; Lanciotti et al., 2012). Estudis recents mostren que MLC1 també interacciona amb la bomba V-ATPasa, encarregada de l'acidificació endosomal. Aquests resultats suggereixen que MLC1 podria estar involucrat en la regulació de l'acidesa dels orgànuls, possiblement per la limitació de l'acidificació de les vesícules (Brignone et al., 2014). Tot i així, en el ratolí *knock-out* de MLC1 no s'ha observat cap canvi en l'expressió o localització d'aquelles proteïnes associades a MLC1, incloent el canal aquaporina4 i el canal permeable a Ca^{2+} TRPV4 (Dubey et al., 2014).

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

1.3.3.3. Mutacions en MLC1.

Les mutacions descrites fins al moment en pacients afectats per MLC es troben distribuïdes al llarg de tot el gen. Diferents grups han realitzat estudis de les mutacions en sistemes heteròlegs, incorporant mutacions *missense* mitjançant mutagènesi dirigida. S'ha observat que la majoria d'aquestes mutacions mostren una disminució en els seus nivells d'expressió i una menor capacitat d'arribada a la membrana plasmàtica en comparació amb la proteïna *wild-type* (Teijido et al., 2004). En la **Taula 2** es mostra un resum de les mutacions en *MLC1* descrites en pacients fins al moment.

Zona de mutació	Típus de Mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna	Zona de mutació	Típus de Mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna
Exó 2	Deleció	c.109delC	p.Leu37CysfsX21	Exó 5	Missense	c.373T>C	p.Cys125Arg
Exó 2	Deleció	c.136delT	p.Cys46AlafsX12	Exó 5	Missense	c.388G>A	p.Gly130Arg
Exó 4	Deleció	c.268_422del	p.Cys90_Gln377delins38	Exó 5	Missense	c.422A>G	p.Asn141Ser
Exó 4,5	Deleció	c.299_423+108del	p.Val100AspfsX39	Exó 5	Missense	c.423C>A	p.Asn141Lys
Exó 5	Deleció	c.324delT	p.Asn110ThrfsX12	Exó 6	Missense	c.470C>A	p.Ala157Glu
Exó 6	Deleció	c.449_455del	p.Leu150ArgfsX9	Exó 8	Missense	c.604G>A	p.Glu202Lys
Exó 6	Deleció	c.514_515delAA	p.Lys172GlufsX8	Exó 8	Missense	c.629T>A	p.Val210Asp
Exó 7	Deleció	c.594_597delCTCA	p.Tyr198X	Exó 8	Missense	c.634G>A	p.Gly212Arg
Exó 7	Deleció	c.597_597+33del	p.Val200SerfsX4	Exó 8	Missense	c.635G>A	p.Gly212Glu
Exó 10	Deleció	c.793delA	p.Ser265AlafsX20	Exó 9	Missense	c.733G>C	p.Ala245Pro
Exó 10	Deleció	c.849delC	p.Met284X	Exó 9	Missense	c.736A>C	p.Ser246Arg
Exó 11	Deleció	c.907_930del	p.Leu307_Leu314del	Exó 10	Missense	c.806C>A	p.Ser269Tyr
Exó 11	Deleció	c.921_926del	p.Leu309_Leu310del	Exó 10	Missense	c.809C>G	p.Pro270Arg
Exó 11,12	Deleció	c.1059+567	p.?	Exó 10	Missense	c.821C>T	p.Thr274Ile
Exó 2	Duplicació	c.111_112dupGC	p.Gln38ArgfsX21	Exó 10	Missense	c.823G>A	p.Ala275Thr
Exó 2	Duplicació	c.135dupC	p.Cys46LeufsX34	Exó 10	Missense	c.824C>A	p.Ala275Asp
Exó 5	Duplicació	c.357dupT	p.Ala120CysfsX61	Exó 10	Missense	c.832C>T	p.Tyr278His
Exó 6	Duplicació	c.456_460dupGGAGC	p.Leu154ArgfsX9	Exó 10	Missense	c.839C>T	p.Ser280Leu
Exó 11	Duplicació	c.927_929dupGCT	p.Leu310dup	Exó 10	Missense	c.880C>T	p.Pro294Ser
Exó 5	Ins + Del	c.337_353delinsG	p.Ile113GlyfsX4	Exó 11	Missense	c.959C>A	p.Thr320Lys
Exó 11	Ins + Del	c.908_918delinsGCA	p.Val303GlyfsX4	Exó 11	Missense	c.976T>C	p.Cys326Arg
Exó 2	Missense	c.65G>A	p.Arg22Gln	Exó 3	Nonsense	c.213C>G	p.Tyr71X
Exó 2	Missense	c.95C>T	p.Ala32Val	Exó 8	Nonsense	c.701G>A	p.Trp234X
Exó 2	Missense	c.178G>A	p.Gly59Gln	Exó 2	Deleció	c.177+1delG	p.?
Exó 3	Missense	c.206C>T	p.Ser69Leu	Intró 5	Duplicació	c.423+2dup	p.?
Exó 3	Missense	c.218G>A	p.Gly73Glu	Intró 2	Substitució	c.178-10T>A	p.?
Exó 3	Missense	c.235G>A	p.Glu79Lys	Intró 5	Substitució	c.423+6T>C	p.?
Exó 3	Missense	c.238A>G	p.Met80Val	Intró 2	Splicing	c.177+1G>T	p.?
Exó 3	Missense	c.240G>A	p.Met80Ile	Intró 2	Splicing	c.222-6T>C	p.?
Exó 3	Missense	c.249G>T	p.Leu83Phe	Intró 3	Splicing	c.267+1G>C	p.?
Exó 3	Missense	c.250C>T	p.Arg84Cys	Intró 3	Splicing	c.268+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.250C>A	p.Arg84Ser	Intró 4	Splicing	c.322-1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.251G>A	p.Arg84His	Intró 4	Splicing	c.322-2A>G	p.?
Exó 3	Missense	c.255G>T	p.Cys85Trp	Intró 5	Splicing	c.423+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.263G>T	p.Gly86Val	Intró 7	Splicing	c.597+1G>A	p.?
Exó 3	Missense	c.268T>G	p.Cys90Gly	Intró 8	Splicing	c.714+1G>A	p.?
Exó 4	Missense	c.274C>T	p.Pro92Ser	Intró 9	Splicing	c.772-1G>C	p.?
Exó 4	Missense	c.278C>T	p.Ser93Leu	Intró 10	Splicing	c.895-1G>C	p.?
Exó 5	Missense	c.353C>G	p.Thr118Arg	Intró 10	Splicing	c.895-2A>G	p.?
Exó 5	Missense	c.353C>T	p.Thr118Met	Intró 10	Splicing	c.895-226T>G	p.?
Exó 5	Missense	c.359C>T	p.Ala120Val	Intró 11	Splicing	c.1060-2A>G	p.?

Taula 2. Mutacions del gen *MLC1* identificades en pacients de MLC. Taula adaptada de (van der Knaap et al., 2012). Ins+Del: Inserció + Deleció.

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

1.3.4. La proteïna GlialCAM.

El gen *GLIALCAM* codifica per una proteïna de membrana que porta el mateix nom (Moh et al., 2005). La proteïna humana està formada per 416 aminoàcids i el seu pes molecular es troba al voltant dels 72 kDa. *GLIALCAM* va ser originalment identificat com *HEPACAM*, un putatiu gen supressor de tumors en el fetge humà (Moh et al., 2005).

Diferents treballs han mostrat que GlialCAM és una glicoproteïna transmembrana de tipus I amb una estructura similar a les IgCAMs, com les JAMs (*junctional adhesion*

molecules) i les ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecules*) (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005).

Mitjançant programes informàtics s'ha predit una regió extracel·lular que conté un pèptid senyal i dos dominis *Immunoglobulin-like*: un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim al domini transmembrana. La proteïna presenta un sol domini transmembrana i una cua citoplasmàtica intracel·lular (Gaudry et al., 2008; Moh et al., 2005). El domini extracel·lular presenta 6 llocs putatius de N-glicosilació, mentre que el domini citoplasmàtic conté un domini d'unió a PDZ de tipus III, una zona rica en prolines que putativament poden representar llocs d'unió a dominis SH3 i llocs potencials de fosforilació per les serina/treonina quinases i les tirosina quinases (Moh et al., 2005) (**Figura 9**).

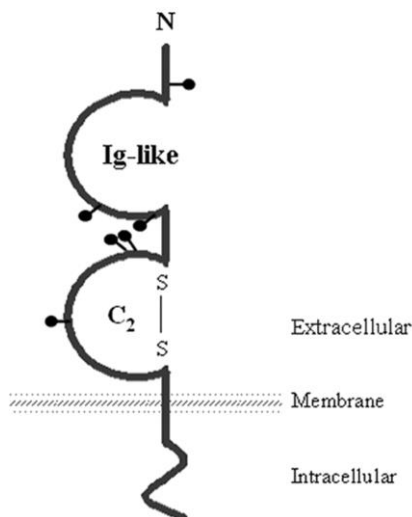


Figura 9. Representació esquemàtica de l'estructura secundària de GlialCAM. GlialCAM presenta l'estructura típica de les molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines. Conté un fragment extracel·lular que inclou un domini IgV pròxim a l'extrem N-terminal i un domini IgC2 pròxim a la regió transmembrana amb un pont disulfur format entre dos residus de cisteïna (S-S). A més a més, presenta una regió transmembrana seguida d'una cua citoplasmàtica. La proteïna presenta 6 llocs putatius de N-glicosilació a la part extracel·lular (representats en forma de punts negres) (Moh et al., 2005).

1.3.4.1. Expressió i localització de GlialCAM.

L'any 2008 es va clonar per primer cop el cDNA de GlialCAM d'una llibreria de cervell humà. Es va observar que l'expressió de GlialCAM en el fetge humà és molt baixa i inexistent en el ratolí. A més a més, es va observar que GlialCAM es troba present principalment en el sistema nerviós tant en humans com en ratolí (Favre-Kontula et al., 2008).

Així doncs, GlialCAM es localitza en la substància blanca, en les cèl·lules endodials i en els peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. A més a més, s'ha observat la presència de GlialCAM en les regions de contacte entre la mielina i els axons, sobre

les capes externes de la mielina (**Figura 10 A**) i en diferents etapes de maduració dels oligodendròcits (Favre-Kontula et al., 2008; López-Hernández et al., 2011a).

Mitjançant estudis de microscòpia electrònica s'ha descrit la colocalització de GlialCAM amb MLC1 a les unions astrocitàries (**Figura 10 B**) (López-Hernández et al., 2011a). Aquesta localització en astròcits depèn del citoesquelet d'actina, ja que un dany en els microfilaments d'actina afecta a la localització de GlialCAM (Duarri et al., 2011; Moh et al., 2009).

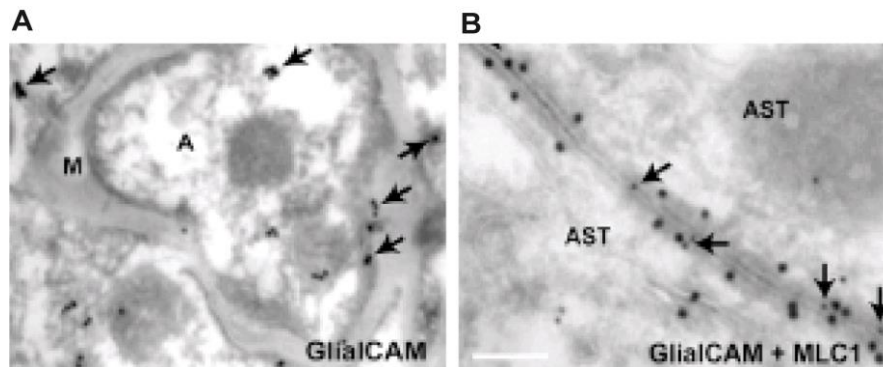


Figura 10. Imatges de microscòpia electrònica d'una mostra de teixit cerebral humà. **(A)** Mitjançant *immunogold* s'observa la localització de GlialCAM en els axons, en les regions de contacte de la mielina i al voltant de la mielina. **(B)** Mitjançant una doble *immunogold* s'observa la colocalització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

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

A més, estudis realitzats en cultius primaris d'astròcits de rata mostren GlialCAM localitzat en la membrana plasmàtica amb una concentració de la proteïna en les regions de contacte entre astròcits (Duarri et al., 2011; López-Hernández et al., 2011a). Gràcies als resultats obtinguts d'estudis realitzats en línies cel·lulars s'ha suggerit que la localització de GlialCAM depèn de la confluència cel·lular. En condicions d'alta confluència es localitza majoritàriament a la membrana cel·lular i a les regions de contacte entre cèl·lules, mentre que en condicions de baixa confluència mostra una localització difosa en el citosol (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005).

1.3.4.2. Estructura i funció de la proteïna GlialCAM.

Mitjançant estudis de WB, coimmunoprecipitació o amb la utilització de *cross-linkers* s'ha suggerit que GlialCAM oligomeritza formant interaccions homofíliques. S'ha utilitzat aquests mateixos *cross-linkers* per identificar si la formació dels homodímers és en *cis* o en *trans*, utilitzant-los amb cèl·lules adherides a una placa o en suspensió, on s'ha observat que la homodimerització es dona majoritàriament en *cis* (Moh et al., 2005).

Tenint en compte aquests resultats, s'ha suggerit que aquests *cis*-homodímers podrien ser importants per a les propietats d'adhesió. D'una banda, s'ha demostrat l'homodimerització en *cis* de GlialCAM per mitjà d'altres mètodes com el mètode de complementació de fragments de proteïnes *split*-TEV (Capdevila-Nortes et al., 2012; López-Hernández et al., 2011b). Per altra banda, el domini citoplasmàtic presenta regions riques en prolines que proporciona putatius llocs d'unió a dominis SH3 i possibles llocs de fosforilació de serina/treonina i de tirosines quinases. Aquests podrien ser importants per les cascades de senyalització que controlen l'adhesió, la migració o la morfologia cel·lular així com processos relacionats amb el citoesquelet i la localització (Moh et al., 2005).

La funció que du a terme GlialCAM en el cervell humà roman encara desconeguda. Fins al moment, els estudis realitzats amb GlialCAM (sota el nom d'HepaCAM) han estat enfocats en el context del càncer (Moh et al., 2005). Tot i així, s'ha observat que la presència de la proteïna és molt baixa o fins i tot inexistent en diferents teixits tumorals i línies cel·lulars. Estudis realitzats en cèl·lules de glioblastoma humà han mostrat que GlialCAM indueix la diferenciació d'aquestes cèl·lules. S'ha descrit que una alta quantitat de la proteïna accelera l'adhesió cel·lular i inhibeix la migració i proliferació, mentre que una baixa quantitat o un trencament de l'adhesió cel·lular contribueixen a la migració i proliferació accelerant la progressió tumoral i la metastasi (Lee et al., 2009; Xun et al., 2010).

Un cop establert que *GLIALCAM* era el segon gen implicat en la malaltia es van realitzar diferents aproximacions per poder entendre millor el seu rol en la leucodistrofia MLC. Estudis bioquímics i d'interacció van mostrar que MLC1 i GlialCAM interaccionen de manera directa i que GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1, necessària per al correcte tràfic de MLC1 a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011a, 2011b). Fins al moment, s'havia descrit que l'expressió i localització de GlialCAM eren independents de MLC1, ja que per si sola era capaç de localitzar-se en les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011b) però recentment, gràcies als

resultats obtinguts en el ratolí *knock-out* de MLC1 i en el peix *knock-out* per MLC1, s'ha observat com la manca de MLC1 provoca la deslocalització de GlialCAM en les cèl·lules gials, indicant que MLC1 juga un paper estabilitzador sobre la proteïna GlialCAM (Hoegg-Beiler et al., 2014; Sirisi et al., 2014).

Recentment, mitjançant l'ús d'RNA d'interferència s'ha generat un model *knock-down* de GlialCAM que ha permès estudiar els efectes que provoca l'absència de GlialCAM en la cèl·lula. S'ha observat que la supressió de GlialCAM provoca una reducció dels nivells proteics de MLC1 i una deslocalització de MLC1 la qual es troba localitzada intracel·lularment. Aquesta deslocalització de MLC1 comporta una disminució de l'activitat VRAC i la formació de vacuoles intracel·lulars. Mitjançant estudis de complementació en aquest model *knock-down*, s'ha observat que GlialCAM pot revertir l'aparició de vacuoles causades per l'absència de GlialCAM, té la capacitat de localitzar de nou MLC1 a les unions astrocitàries i d'activar novament les corrents VRAC (Capdevila-Nortes et al., 2013).

1.3.4.3. Mutacions en *GLIALCAM*.

Les mutacions identificades en el gen *GLIALCAM* descrites en pacients afectats per MLC (**Taula 3**) es localitzen al domini extracel·lular de la proteïna i no en el domini transmembrana o citoplasmàtic, a excepció de la mutació W263X que provoca la truncació de la proteïna i es troba localitzada al final del domini transmembrana (López-Hernández et al., 2011a). Cal destacar que les mutacions amb un patró d'herència dominant es troben acumulades en el domini immunoglobulina IgV de la proteïna, en canvi, les mutacions amb un patró d'herència recessiva es troben distribuïdes a llarg de tota la regió extracel·lular.

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

Estudis de localització de les mutacions a nivell cel·lular, mostren que el defecte en el tràfic tant de GlialCAM com de MLC1 a les unions cel·lulars provocat per les mutacions recessives pot ser recuperat per la coexpressió de GlialCAM *wild-type*, mentre que el mateix defecte causat per les mutacions dominants no pot ser recuperat per la proteïna *wild-type* (López-Hernández et al., 2011a).

S'han realitzat estudis de complementació del model *knock-down* de GlialCAM amb mutacions en *GLIALCAM* descrites en pacients de MLC, R92Q i R92W, per les quals s'ha descrit un defecte bioquímic. La complementació del model amb aquestes mutacions comporta la recuperació dels nivells d'expressió de MLC1 però no recuperen la correcta localització de la proteïna a les unions astrocitàries. Aquestes mutacions tampoc reverteixen l'aparició de les vacuoles intracel·lulars causades per la manca de GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013).

Zona	Tipus de mutació	Mutació en DNA	Mutació en proteïna	Herència
Exó 2	Deleció	c.404_406delAGA	p.Lys135del	Dominant
Exó 3	Deleció	c.461_462delCA	p.Ser154TyrfsX17#	Recessiva
Exó 3	Ins + Del	c.580_582delinsTT	p.Leu194PhefsX61	Recessiva
Exó 1	Missense	c.68T>A	p.Leu23His	Recessiva
Exó 2	Missense	c.176G>A	p.Ser59Asn	Dominant
Exó 2	Missense	c.265G>A	p.Gly89Ser	Dominant
Exó 2	Missense	c.266G>A	p.Gly89Asp	Dominant
Exó 2	Missense	c.275G>A	p.Arg92Gln	Recessiva
Exó 2	Missense	c.274C>T	p.Arg92Trp	Dominant
Exó 2	Missense	c.292C>T	p.Arg98Cys	Recessiva
Exó 2	Missense	c.382G>A	p.Asp128Asn§	Dominant
Exó 3	Missense	c.442C>T	p.Pro148Ser	Recessiva
Exó 3	Missense	c.587C>A	p.Ser196Tyr	Recessiva
Exó 3	Missense	c.631G>A	p.Asp211Asn	Recessiva
Exó 2	Nonsense	c.298C>T	p.Arg100X	Recessiva
Exó 4	Nonsense	c.789G>A	p.Trp263X	Recessiva
Exó 2	Missense	c.167A>C	p.Glu56Pro	Dominant
Exó 2	Missense	c.217C>T	p.Arg73Trp	Recessiva
Exó 2	Nonsense	c.166C>T	p.Glu56X	Recessiva

Taula 3. Mutacions en *GLIALCAM* descrites en pacients afectats per MLC. Taula adaptada de (van der Knaap et al., 2012). Ins +Del: Inserció+Deleció.

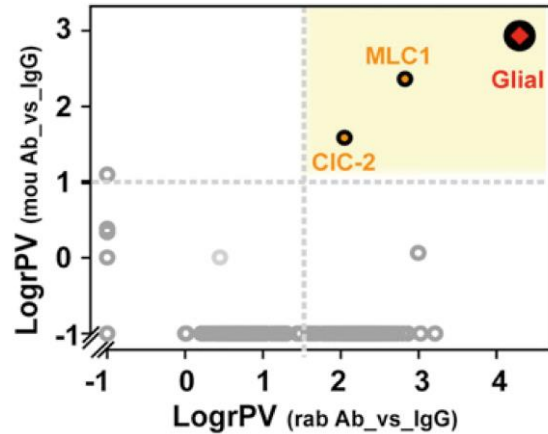
1.3.5. La proteïna CIC-2

Després d'identificar *GLIALCAM* com a segon gen associat a la malaltia i d'observar que no tot GlialCAM es trobava associat a MLC1, ja que a diferència de MLC1 GlialCAM s'expressava també en oligodendròcits, el grup es va plantejar utilitzar la mateixa estratègia que es va seguir per a trobar proteïnes que interaccionessin amb MLC1. D'aquesta manera, es van realitzar novament estudis de proteòmica i d'immunoprecipitació mitjançant extractes de membrana de cervells de ratolí utilitzant dos anticossos contra la proteïna GlialCAM (un monoclonal fet en ratolí i un policlonal fet en conill i purificat en el nostre laboratori). Com en el cas anterior, aquests estudis es van realitzar en col·laboració amb l'empresa *Logopharm*.

Els resultats van mostrar la presència de pèptids corresponents a GlialCAM i a MLC1, tal i com s'esperava, però també es van mostrar pèptids corresponents al canal de Cl⁻

CIC-2 que copurificaven amb GlialCAM (**Figura 11**). Es van realitzar estudis de WB per tal de verificar que CIC-2 copurificava almenys amb una fracció de GlialCAM (Jeworutzki et al., 2012).

Figura 11. Identificació de CIC-2 com a proteïna associada a l'interactoma de GlialCAM. Avaluació de la purificació per afinitat de GlialCAM en extractes de membrana de cervell de ratolí (Jeworutzki et al., 2012).



Estudis d'interacció, localització i electrofisiològics van mostrar que GlialCAM actua com a subunitat β auxiliar de CIC-2. GlialCAM té la capacitat d'interaccionar en *cis* amb CIC-2, de dirigir el seu tràfic a unions cel·lulars i és capaç d'incrementar la seva activitat i modificar les seves propietats de canal (Jeworutzki et al., 2012).

Tot i així, no s'ha pogut descriure cap interacció directe entre MLC1 i CIC-2 (Duarri et al., 2011) i no s'ha observat canvis en l'expressió i la localització de GlialCAM i MLC1 en el ratolí *knock-out* de CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012), però la identificació de GlialCAM com a subunitat β auxiliar de CIC-2 a les cèl·lules glials, és una característica que pot involucrar el canal de manera indirecta en la fisiopatologia de MLC.

1.4. TERÀPIES PER ALS PACIENTS AFECTATS PER MLC.

Degut al desconeixement de les funcions que poden desenvolupar les principals proteïnes involucrades en la malaltia, MLC1 i GlialCAM, es fa difícil entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Per aquest motiu, no s'ha pogut desenvolupar cap tractament i únicament se'ls pot aplicar mètodes pal·liatius dels diferents símptomes de la malaltia, o bé disminuir la incidència d'aquests símptomes gràcies al diagnòstic prenatal.

2. EL CANAL DE CLORUR CIC-2.

El transport de Cl⁻ serveix per a molts propòsits, incloent els transport de sal i fluids a través de l'epiteli, el control de l'excitabilitat muscular i neuronal, la regulació del volum cel·lular i l'acidificació d'òrgànuls intracel·lulars. La translocació de Cl⁻ a través de les membranes biològiques té lloc per mitjà dels processos de transport i difusió de Cl⁻ pels transportadors i canals iònics.

Avui en dia, es coneix un gran nombre de trastorns genètics associats a canals iònics, anomenats canalopaties. Donat que els canals iònics s'expressen en diferents teixits del cos humà, qualsevol defecte del canal iònic s'associa a un gran rang de trastorns, que poden incloure epilèpsia, migranya, ceguesa, sordesa, diabetis, hipertensió, arítmia cardíaca, asma i càncer (Ashcroft, 2006; Valverde et al., 2011). Aquestes canalopaties estan causades principalment per mutacions en els canals iònics de K⁺, Na⁺, Ca²⁺ i Cl⁻.

El canal de Cl⁻ CIC-2 és codificat pel gen *CLCN2* i pertany al grup de canals iònics de la família CLC. Es troba expressat ubíquament, presentant una alta expressió en l'intestí, estómac, glàndules salivars, cor, ronyó i cervell (Gründer et al., 1992; Thiemann et al., 1992).

En el cervell, CIC-2 s'expressa en neurones, oligodendròcits i astròcits (Blanz et al., 2007; Jeworutzki et al., 2012; Sík et al., 2000). Existeixen diferències en la distribució de Cl⁻ entre astròcits i oligodendròcits, on els oligodendròcits tenen una menor acumulació de Cl⁻ que els astròcits. Normalment, hi ha una clara correlació entre la permeabilitat al Cl⁻ en fase de repòs i la distribució dels ions Cl⁻ a través de la membrana. Així, una alta permeabilitat en estat de repòs tendeix a una menor acumulació de l'anió al no poder equilibrar el flux passiu regulat pel canal. En canvi, una baixa permeabilitat dona lloc a una acumulació de Cl⁻. S'hipotetitza que hi ha una baixa conductància a Cl⁻ en fase de repòs en els astròcits i per contra, una alta permeabilitat a Cl⁻ en fase de repòs en els oligodendròcits (Kimmelberg et al., 2006; Walz, 2002).

A nivell cel·lular, CIC-2 es localitza a les membranes basolaterals de les cèl·lules polaritzades *in vitro* i *in vivo*. Tot i així, una gran proporció del canal es detecta intracel·lularment. S'ha suggerit que quan aquest es troba de manera intracel·lular podria estar associat a estructures intracel·lulars membranoses, mentre que quan CIC-2 es troba en la membrana cel·lular apareix en agregats i possiblement associat a basses lipídiques (*lipid rafts*) (Cornejo et al., 2009).

2.1. PROPIETATS BIOFÍSQUES DEL CANAL CIC-2.

La proteïna CIC-2 consta de 907 aminoàcids amb un pes molecular de 99 kDa. Presenta una estructura funcional homodimèrica anomenada *double-barrelled* on cada subunitat és idèntica i conté 18 hèlix transmembrana (anomenades de la A a la R, **Figura 12**) on tant l'extrem N-terminal com el C-terminal són citosòlics. En l'extrem C-terminal s'hi localitzen dos dominis CBS altament conservats (*cystathionine-β-synthase*), dominis necessaris per al correcte tràfic intracel·lular de la proteïna (Bateman, 1997; Ponting, 1997). S'ha descrit que delecions en aquests dominis alteren el mecanisme d'obertura comú (*common gate*) i suggereixen que poden estar implicats també en la interacció i l'oligomerització de la proteïna (Estévez et al., 2004). Mitjançant assaigs de cristal·lografia s'ha descrit que els dominis CBS1 i CBS2 del canal es troben units dins de la pròpia subunitat i també als dominis CBS del monòmer associat (Markovic and Dutzler, 2007).

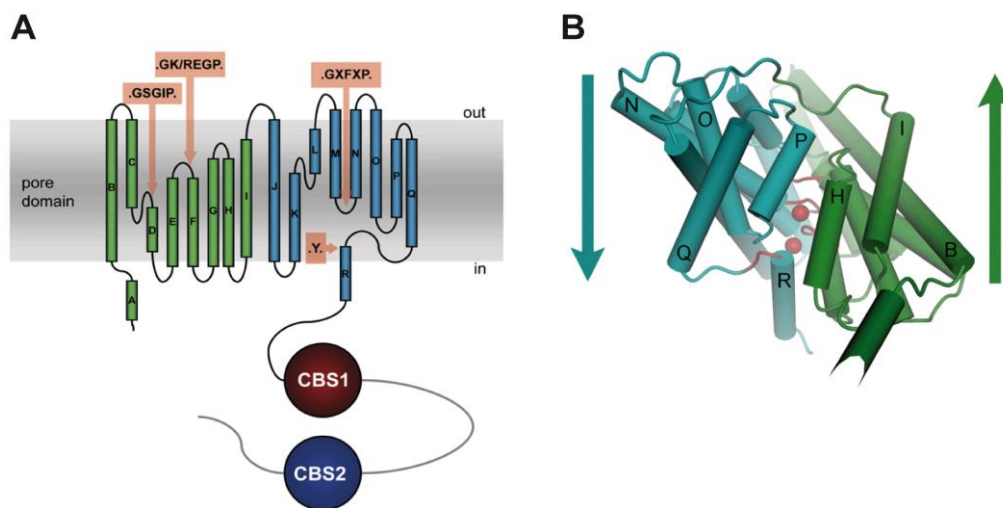


Figura 12. Topologia i estructura de les proteïnes CIC-2. (A) Topologia esquemàtica monomèrica de la proteïna CIC-2. Les 18 hèlixs α s'etiqueten de la A a la R. Les seqüències assenyalades, que contribueixen a la selectivitat a Cl^- del canal es marquen amb fletxes (marró) i es mostren les respectives seqüències conservades. Els dos dominis CBS de la cua citoplasmàtica es mostren com a esferes vermelles i blaves. (B) Vista de les dues meitats de la proteïna on la seva orientació s'indica amb les fletxes. Les esferes vermelles mostren els ions d'unió i en vermell es mostren les regions de la proteïna que contribueixen a la selectivitat iònica. Imatge extreta de (Dutzler, 2007).

Cada subunitat del dímer té el seu propi porus aquós de translocació iònica, localitzat en el centre de la subunitat. Aquests porus aquosos permeten el flux selectiu d'ions tant d'entrada com de sortida de manera eficient (fins a 10^6 ions per segon). Aquest flux d'ions crea corrents elèctriques suficientment potents com per produir canvis ràpidament en el voltatge transmembrana, que és la diferència del potencial elèctric entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula.

2.1.1. *Gating* del canal CIC-2.

Aquest canal es troba tancat en condicions de repòs i s'activa lentament per l'hiperpolarització de la membrana (-40 a -140 mV) relativa a l'equilibri de potencial del Cl⁻ (-30 mV) i pot ser activat i modulat per l'acidificació externa en la qual el canal s'activa per una moderada acidificació (màxima activitat del canal a pH 6) seguida per un brusc tancament del canal a valors de pH pròxims a pH 7 (Niemeyer et al., 2009). Sota condicions hipotòniques, l'inflament cel·lular accelera l'activació del canal i augmenta les amplituds de les corrents regulades per CIC-2, en canvi, el desinflament cel·lular en condicions hipertòniques inhibeix les corrents (Duan et al., 2000; Gründer et al.; Hume et al., 2000).

El canal CIC-2 s'obre i es tanca per mitjà de dos processos independents anomenats *fast gating* i *common gating*. El *fast gating*, que actua en mil·lisegons, és un simple canvi conformacional d'obertura/tancament que té lloc en cada porus aquós de manera independent l'un de l'altre. Aquest, està controlat per tres variables fisiològiques: pH, concentració de Cl⁻ i voltatge. En canvi, el *common gating* amaga o exposa ambdós porus simultàniament a través del moviment cooperatiu dels dominis CBS; així doncs, aquest procés es desenvolupa més lentament (Accardi and Pusch, 2000; Estévez and Jentsch, 2002; Miller, 1982). Mutacions que modifiquen el *common gating* es troben normalment localitzades prop de la interfase dimèrica (Duffield et al., 2003).

Experiments de mutagènesi han aportat informació sobre les regions responsables del mecanisme d'obertura d'aquests canals. Així, mutacions a l'extrem N-terminal de CIC-2 resulten en canals constitutivament oberts, amb una relació corrent-voltatge gairebé lineal, fent-los insensibles a canvis de pH i osmolaritat extracel·lulars. Aquests resultats indiquen que els dominis necessaris per l'activació depenent de voltatge, augments de volum i pH es situen en aquest extrem i s'han descrit com dominis essencials (Jordt and Jentsch, 1997). En canvi, delecions en al regió C-terminal de CIC-2 produeixen canals parcialment oberts que mantenen la seva resposta al voltatge i a canvis osmòtics i per això s'han denominat dominis moduladors (Gründer et al., 1992).

La cristal·lització de les proteïnes bacterianes dels canals CLC ha permès completar els resultats obtinguts amb els experiments de mutagènesi i corroborar l'estructura formada per dues subunitats idèntiques amb porus independents predita amb altres tècniques. Aquests estudis mostren com la regió més estreta del filtre de selectivitat del porus consta de tres llocs d'unió al Cl⁻ amb interaccions electrostàtiques. S'ha proposat que quan el canal es troba tancat, un dels llocs d'unió és ocupat per un grup

carboxil glutamat altament conservat en els canals CLC, mentre que en obrir-se, possiblement per un canvi conformacional, aquest residu es desplaçaria deixant espai per a un Cl⁻ addicional (Dutzler, 2004). Estudis de mutagènesi dirigida han demostrat que el mateix residu glutamat a l'inici de l'hèlix F, el qual el seu moviment és necessari per a la translocació del protó en les proteïnes transportadores CLC, és important per al *fast gating* de CIC-0, CIC-1 i CIC-2, anomenant-lo el "*gating glutamate*" (Dutzler et al., 2003; Fahlke et al., 1997; Niemeyer et al., 2003; de Santiago et al., 2005). A més a més, la neutralització del *gating glutamate* (E217) provoca una pèrdua de sensibilitat al Cl⁻ intracel·lular i a voltatge (Niemeyer et al., 2003).

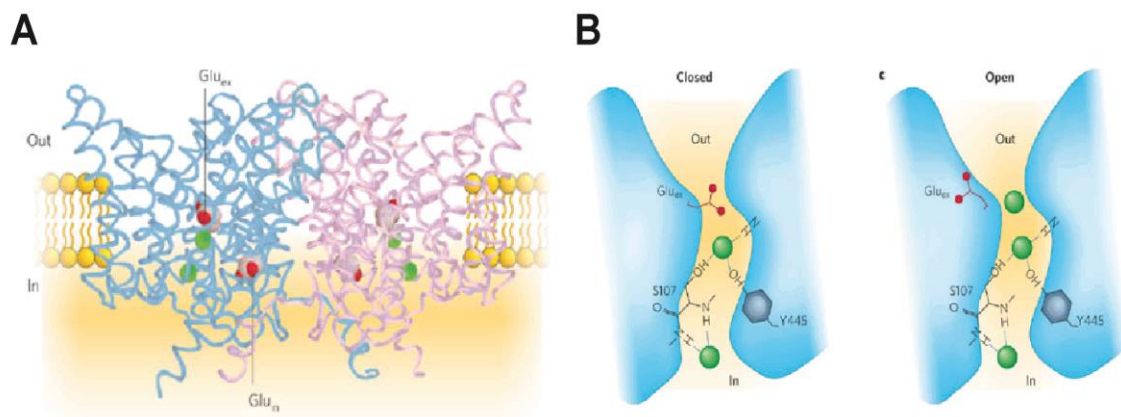


Figura 13. Estructura i *gating* de la proteïna CIC-2. (A) Representació de la proteïna homodimèrica en la membrana lipídica, amb les dues subunitat colorejades diferents. Els ions Cl⁻ es mostren com a esferes verdes i els dos residus glutamat transportadors de protons es troben identificats en vermell. (B) Representació diagramàtica de la regió d'unió a Cl⁻ en les conformacions tancada i oberta (*closed/open*) definides per la posició de Glu_{ex}. La conformació tancada mostra dos ions Cl⁻ en les posicions "central" i "interna"; un tercer ió Cl⁻ en la posició "externa" apareix en la conformació oberta. Imatge estreta de (Miller, 2006).

Similarment als seus homòlegs CIC-0 i CIC-1, la seqüència de permeabilitats descrita pels corrents regulats per CIC-2 és Cl⁻ ≥ Br⁻ >> I⁻ ≥ F⁻ (Stölting et al., 2013; Thiemann et al., 1992). Aquesta selectivitat aniònica s'ha detectat en diferents treballs i tipus cel·lulars i es considera una característica típica de CIC-2 (Jentsch et al., 2002).

2.1.2. Propietats farmacològiques de CIC-2

La farmacologia de CIC-2 i dels canals iònics CLC en general resulta difícil per la manca de bloquejants específics. No obstant, nombrosos treballs demostren que la corrent de Cl⁻ de CIC-2 es bloqueja per diferents compostos depenent del tipus cel·lular.

S'ha descrit que CIC-2 es bloqueja per derivats de l'àcid carboxílic (com per exemple, DPC, NPPB i Cd^{2+}) però és insensible a tamoxifen (TMX) i SITS (Duan et al., 2000; Furukawa et al., 1998). A part d'aquests compostos, la toxina GaTx2 inhibeix amb alta afinitat CIC-2 alentint la seva activació però no bloqueja els canals oberts. GaTx2 no afecta cap dels altres canals de Cl^- i és considerat un inhibidor específic de CIC-2 (Thompson et al., 2009).

Com a complementació als inhibidors de CIC-2, aquests poden ser activats també per agents farmacològics. Així l'omeprazol, quan és activat per àcid, forma espècies carregades que reaccionen amb les cisteïnes de les proteïnes (Keeling et al., 1985); el canal CIC-2 consta d'aquests residus de cisteïna que són accessibles a les espècies reactives de l'omeprazol (Cuppoletti et al., 2001).

2.2. REGULACIÓ DEL CANAL CIC-2.

La regulació de CIC-2 té lloc tant a nivell d'expressió com funcionalment, afectant els nivells de mRNA de CIC-2 i/o proteïna així com l'activitat del canal CIC-2.

L'acidificació extracel·lular augmenta les corrents regulades per CIC-2 mentre que l'alcalinització les disminueix en expressar la proteïna de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* (Jordt and Jentsch, 1997) i la proteïna endògena en cèl·lules de mamífer (Clark et al., 1998). El pH àcid, activaria CIC-2 protonant un residu glutamat del porus, ja que s'ha descrit que en mutar-lo es perd la modulació del canal per pH àcid (Niemeyer et al., 2003). L'activació màxima del canal es dona a un pH proper a 6.5 i s'inhibeix amb una acidificació més potent (Arreola et al., 2002; Jordt and Jentsch, 1997), inhibint-se irreversiblement a pHs superiors a 9. Aquesta complexa modulació de CIC-2 pel pH extracel·lular es podria explicar per l'existència de dos llocs d'unió a H^+ independents, que modulen la seva activitat desplaçant la seva dependència a voltatge (Arreola et al., 2002).

Les corrents de CIC-2 s'incrementen degut a l'augment del volum cel·lular induït per hipotonicitat quan s'expressa en oòcits de *Xenopus* (Thiemann et al., 1992), fet que suggereix que el canal podria estar involucrat en mecanismes de regulació del volum cel·lular (Jordt and Jentsch, 1997). Fins ara, hi ha poques evidències sobre la regulació de CIC-2 per fosforilació quan el canal s'expressa de manera heteròloga. S'ha descrit que aquest canal no s'activa per fosforilació dependent d'AMPc en oòcits de *Xenopus* (Furukawa et al., 1998) tot i que en alguns treballs es mostra que les corrents endògenes podrien estar modulades per fosforilació (Fritsch and Edelman, 1996), suggerint que aquest mecanisme de regulació pot requerir proteïnes

associades. En presència de PKA intracel·lular, es dona una activació de CIC-2 i aquesta activació pot ser suprimida per l'inhibidor de PKA, mPKI i H-89 (Kajita et al., 2000; Tewari et al., 2000). A més a més, experiments de mutagènesi dirigida han permès determinar dos llocs responsables de l'activació de PKA situats a l'extrem C-terminal del canal CIC-2 en humans (Cuppoletti et al., 2004).

Factors que alteren els nivells d'expressió de CIC-2 també podrien estar regulant la seva activació. Diferents treballs han descrit augments en l'expressió de CIC-2 al ronyó per l'acció d'hormones que modulen la reabsorció renal com l'aldosterona (Ornellas et al., 2002) i la vasopressina (Morales et al., 2001), suggerint un rol del canal en el transport de Cl⁻. Els nivells d'expressió de CIC-2, tant a nivell de mRNA com a nivell proteic, en el ronyó de rata es troben significativament reduïts quan es realitza una ovariectomia, i aquests nivells es restableixen per l'acció d'estrògens com l'estradiol (Nascimento et al., 2003).

La proteïna de Hsp90 i Hsp70 s'activen en resposta a estrès cel·lular i es troben associades a CIC-2. Aquesta associació dona lloc a una sobreexpressió de l'activitat del canal gràcies a la facilitació de l'obertura del canal i la millora de la sensibilitat a Cl⁻ intracel·lular (Hinzpeter et al., 2006). Per un cantó, la inhibició de Hsp90 comporta una menor arribada de CIC-2 a la membrana plasmàtica i una reducció de l'amplitud de les corrents regulades per CIC-2. Aquesta associació pot tenir importants conseqüències fisiològiques, donant lloc a una major activitat de CIC-2 en resposta a situacions d'estrès cel·lular, com l'elevada temperatura, isquèmia o agents oxidants. No obstant, les bases moleculars d'aquesta interacció encara no s'han descrit.

S'ha descrit que determinats compostos com el TNF- α (Bali et al., 2001) o l'àcid araquidònic (Cuppoletti et al., 2001) poden modular l'activitat de CIC-2 en cèl·lules epitelials de còlon o de pulmó, respectivament. L'activació de CIC-2 per l'àcid araquidònic no s'inhibeix pels inhibidors de PKA. Finalment, CIC-2 podria regular-se per alteracions en el citoesquelet ja que s'ha descrit l'existència d'interaccions electrostàtiques entre l'extrem N-terminal del canal i el citoesquelet d'actina (Ahmed et al., 2000).

Diferents estudis han suggerit que el tràfic endosomal i el reciclatge de CIC-2 està parcialment regulat per vies dependents de rab5 i rab11 (Cornejo et al., 2009; Dhani et al., 2008). Tanmateix, s'ha observat que CIC-2 és objecte d'una ràpida endocitosis, aproximadament un 70% de la proteïna és reciclada passats 4-8 minuts d'internalització. Aquesta internalització per endocitosis és regulada en part per la tirosina 179 present en un *loop* intracel·lular i que tan sols una proporció resideix en els

lipid rafts (Cornejo et al., 2009). Recentment, s'ha descrit que la quinasa JAK2, activada per l'encongiment de la cèl·lula, disminueix l'activitat de CIC-2 en oòcits de *Xenopus* contrarestant així, la sortida de Cl⁻ de la cèl·lula (Hosseinzadeh et al., 2012). Aquesta disminució de l'activitat està associada a una menor quantitat de la proteïna CIC-2 a la membrana cel·lular quan es coexpressa amb JAK2, segurament interferint directament en la inserció de CIC-2 a la membrana.

S'ha suggerit també que tant l'estrès metabòlic, com la depleció d'ATP, indueixen un increment de l'expressió de CIC-2 a la superfície cel·lular degut a una reducció en la seva internalització per endocitosis (Dhani et al., 2008), essent la interacció entre CIC-2 i ATP per mitjà dels dominis CBS de CIC-2 (Stölting et al., 2013).

2.3. FUNCIONS DE CIC-2.

Es segueix sense conèixer el paper fisiològic de CIC-2 completament, però l'expressió ubiqua del canal suggereix que aquestes funcions podrien ser diferents segons el tipus cel·lular on s'expressés. Els diferents rols fisiològics del canal s'han pogut definir gràcies al ratolí *knock-out* de *CLCN2* (Bösl et al., 2001; Cortez et al., 2010; Makara et al., 2003; Nehrke et al., 2002; Nighot et al., 2009; Zúñiga et al., 2004) i als pacients amb mutacions en *CLCN2* (Di Bella et al., 2014; Depienne et al., 2013). Els primers estudis van mostrar que l'absència de la proteïna CIC-2 provoca la degeneració de la cèl·lula germinal masculina i dels fotoreceptors en el ratolí *knock-out* (Bösl et al., 2001). Fins al moment s'ha descrit pocs pacients amb mutacions en *CLCN2*, alguns presenten corioretinopatia amb defectes en el camp de visió (Depienne et al., 2013) i recentment s'ha identificat un pacient que mostra també infertilitat (Di Bella et al., 2014). Tot i així, el paper fisiològic de CIC-2 en la retina i els testicles roman desconegut i tant sols s'ha suggerit que CIC-2 pot ser important per el control de l'ambient iònic de les cèl·lules en aquests teixits.

Les unions *tight* estan formades per una barreja de proteïnes transmembrana unides per mitjà de proteïnes citoplasmàtiques al citoesquelet. Aquestes unions en la zona apical intercel·lular són responsables de la funcionalitat de la barrera, i la pèrdua de la funció de la barrera intestinal contribueix a un gran nombre de malalties intestinals com el trastorn de l'intestí inflamat, trastorns celíacs i lesions de reperfusió isquèmica (Nighot and Blikslager, 2010; Turner, 2006). Hi ha evidències que CIC-2 juga un paper important en la recuperació de la funció de la barrera epitelial després d'una isquèmia a través de l'organització de la reparació de les unions *tight* apicals tals com la Occludina i la Claudina-1 (Moeser et al., 2004; Nighot and Blikslager, 2012). S'ha descrit que l'absència de CIC-2 durant la formació de la monocapa comporta una

localització subapical difosa d'Occludina, que en condicions normals es troba localitzada en la membrana cel·lular i que l'aplicació de l'activador de CIC-2, lubiprostona, en la mucosa afectada per isquèmia restaura la localització d'Occludina en les unions *tight* (Moeser et al., 2007).

La fibrosi quística és un trastorn genètic crònic, progressiu i autosòmic recessiu que afecta principalment les glàndules mucoses de l'organisme i altera críticament els pulmons, pàncrees, fetge i intestins de nens i adults joves. Es caracteritza per un transport anòmal de Cl^- i Na^+ a través de l'epiteli provocant secrecions viscoses i espesses causades per mutacions en el canal de Cl^- CFTR (Yankaskas et al., 2004). Un altre dels rols de CIC-2 suggerit és el de proporcionar una via alternativa per a la secreció epitelial de Cl^- en paral·lel amb el canal de Cl^- CFTR i així, activant els canals endògens de CIC-2 es podria augmentar la conductància de Cl^- en els pacients de fibrosi quística (Schwiebert et al., 1998). Tot i així, estudis realitzats en el ratolí doble *knock-out* per CIC-2 i CFTR mostren que la manca de CIC-2 no provoca una major mortalitat o afectació en comparació amb el ratolí *knock-out* per CFTR, així com tampoc disminueix els nivells de secreció de Cl^- (Zdebik et al., 2004). Així doncs, aquests resultats demostren que CIC-2 no juga cap paper en la recuperació del canal CFTR en la fibrosi quística.

2.3.1. Funcions de CIC-2 associades al sistema nerviós.

Els canals de Cl^- en el cervell regulen diferents processos com per exemple la regulació del volum cel·lular i el transport transepitelial, així com un paper en el control de la concentració intracel·lular de Cl^- en neurones que expressen els receptors inhibitoris de GABA (Jentsch et al., 1999; Smith et al., 1995; Zúñiga et al., 2004).

CIC-2, al igual que MLC1 i GlialCAM, mostra una localització als peus astrocitaris en contacte amb els vasos sanguinis i la glia de Bergmann i a més a més, colocalitza amb GlialCAM a les fibres mielinitzades (Blanz et al., 2007; Jeworutzki et al., 2012). A part, CIC-2 s'expressa en neurones hipocampals piramidals i en algunes interneurons (Smith et al., 1995). També s'ha descrit l'expressió de CIC-2 en els peus terminals astrocitaris contactant amb capil·lars i arterioles en capes específiques del hipocamp (Sík et al., 2000), així com en oligodendròcits (Blanz et al., 2007).

Es coneix que la inhibició sinàptica regulada pels receptors GABA_A requereixen d'un gradient transmembrana de Cl^- . L'activació de CIC-2, pot provocar un augment del Cl^- intracel·lular per sobre de l'equilibri iònic, assegurant una resposta inhibidòria. S'ha descrit l'associació entre l'expressió de CIC-2 i per tant les corrents *inward* associades

amb la resposta inhibitoria per GABA (Staley et al., 1996). S'ha suggerit que la pèrdua completa o parcial de la funció de CIC-2 *per se* és suficient per donar lloc a epilèpsia, contràriament al que s'havia descrit anteriorment (D'Agostino et al., 2004; Saint-Martin et al., 2009). S'ha proposat també una funció del canal CIC-2 de control directe de l'excitabilitat neuronal al proporcionar una conductància basal que regula l'entrada de Cl⁻ i modificar l'excitabilitat afectant la resistència *input* de la neurona (Ratté and Prescott, 2011; Rinke et al., 2010). Aquest pot ser el mecanisme de prevenció per a l'acumulació de Cl⁻ en les sinapsis GABAnergiques actives (Rinke et al., 2010). Tot i així, estudis recents de modelatge (Ratté and Prescott, 2011) junt amb estudis realitzats en CIC-2 de *C.elegans* indiquen que el rol principal de CIC-2 és la regulació de l'entrada de Cl⁻ i no la sortida, regulant la posta d'ous en *C.elegans* per mitjà de la modulació de l'activitat neuronal motora (Branicky et al., 2014). Entendre la funció precisa de CIC-2 pot tenir repercussions importants en el coneixement del control de l'excitabilitat neuronal.

Estudis recents en el model *knock-out* de *CLCN2* mostren un defecte electrofisiològic associat amb l'activació astrocitària, observant-se també evidències de neurodegeneració en la capa CA3 de l'hipocamp (Cortez et al., 2010). Donant suport així, a la possibilitat que l'expressió de CIC-2 jugui un paper neuroprotector en l'hipocamp adult.

S'ha suggerit que la entrada de Cl⁻ regulada per CIC-2 tingui un paper putatiu important en les cèl·lules glials. En un inici, s'havia descrit que les corrents de CIC-2 es veien reduïdes en astròcits immadurs i en astròcits reactius quan hi tenia lloc una lesió, suggerint un paper de CIC-2 en el desenvolupament de les cèl·lules glials (Makara et al., 2003). Més tard, es va observar com s'apreciava la presència de vacuoles espongiformes a les làmines externes de la mielina en ratolins *CLCN2*^{-/-} en edats avançades (Blanz et al., 2007; Bösl et al., 2001). No obstant, el ratolí *knock-out* no presentava defectes neurològics.

La vacuolització observada en el ratolí *knock-out* de *CLCN2* mostrava certa similitud amb la vacuolització que presenten els pacients afectats per MLC (van der Knaap et al., 2012). El fet d'interaccionar directament amb GlialCAM, de localitzar-se en la mateixa regió i de mostrar una vacuolització similar feia pensar que el gen *CLCN2* podria jugar un paper en la fisiopatologia de la MLC. Tot i així, estudis realitzats en pacients amb MLC que no presenten mutacions en el gen *MLC1* o *GLIALCAM* tampoc han mostrat cap mutació en el gen *CLCN2* (Scheper et al., 2010). S'ha suggerit que la disfunció de CIC-2 pot alterar l'homeòstasi iònica en les cèl·lules glials provocant així

la aparició de leucodistròfies tant en humans com en ratolins (Blanz et al., 2007; Depienne et al., 2013).

S'ha descrit que mutacions en *CLCN2* de pèrdua de funció causen leucoencefalopatia amb evidències de microvacuolització de la mielina per mitjà d'imatges de MRI (LKPAT) [MIM #615651]. Aquestes leucoencefalopaties amb edema intramielínic varien tant en l'edat d'inici de la malaltia com en la seva presentació clínica, sent l'atàxia cerebelar lleu la característica principal. A diferència del ratolí *knock-out* per *CLCN2*, el qual presentava retinopatia, només es va detectar en alguns dels pacients de l'estudi tot i que es creu que la retinopatia mostrada per la resta de pacients era massa subtil per ser detectada al fons de l'ull (Depienne et al., 2013).

Basant-se en evidències indirectes, la coexpressió de CIC-2 amb el canal de potassi Kir4.1 i la similitud del fenotips vacuolitzants entre els ratolins *knock-out* de CIC-2 i Kir4.1, juntament amb la doble supressió de les connexines 32 i 47, s'ha suggerit que CIC-2 pot ser important en el procés del *potassium siphoning* (Blanz et al., 2007), el qual és necessari per al reciclatge de l'alta concentració de potassi degut a la secreció d'aquest durant un potencial d'acció a través del sinciti glial cap als vasos sanguinis (Rash, 2010).

Tot i el gran avenç que s'ha arribat a fer gràcies a investigacions clíniques i experimentals, encara queda per entendre en profunditat la relació entre les propietats biofísiques i les funcions cel·lulars de CIC-2, així com la relació entre les funcions cel·lulars i els rols patològics. A més a més, és necessari desenvolupar inhibidors específics de CIC-2 per a poder estudiar els rols fisiopatològics de CIC-2.

3. FISIOLOGIA I FUNCIO ASTROCITÀRIA.

Els astròcits representen un 90% del total de cèl·lules del SNC i per aquesta raó, el seu paper és imprescindible per al correcte funcionament del sistema nerviós.

In vivo, els astròcits presenten una morfologia estrellada amb prolongacions, entre 5 i 8 processos principals, cada un dels quals es ramifica en processos més fins formant una xarxa tridimensional. Aquests processos estan polaritzats en dos dominis funcionals, el primer, on la part més extensa de la membrana s'encara i contacta amb les neurones veïnes i l'altre que es caracteritza per contactar amb els vasos sanguinis (Benarroch, 2005; Nedergaard et al., 2003). Aquests processos altament ramificats es caracteritzen per la presència de la proteïna glial àcida fibrilar (GFAP), proteïna exclusiva d'aquest tipus cel·lular on la seva expressió augmenta amb el grau de diferenciació astrocitària (Bovolenta et al., 1984). No obstant, hi ha estudis que descriuen astròcits negatius per GFAP, principalment en la substància gris (Ogata and Kosaka, 2002).

Cada astròcit ocupa el seu propi espai anatòmic, sense solapar-se amb astròcits veïns, essent aquest el seu domini funcional. Tot i així, la importància fisiològica per la qual no hi ha solapament entre els astròcits es desconeix. Aquesta organització dels astròcits s'anomena illa funcional de sinapsis on diferents sinapsis veïnes poden ser coordinades per senyals derivades d'una única cèl·lula astrocitària (Benarroch, 2005; Halassa et al., 2007). Així doncs, diversos estudis mostren com un únic astròcit està en contacte amb entre 4 i 8 somes neuronals i amb entre 300 i 600 dendrites procedents de diferents neurones (Benarroch, 2005; Theodosis et al., 2008).

En funció de la morfologia de les prolongacions dels astròcits, aquests es poden classificar en astròcits protoplasmàtics i fibrosos. Els astròcits protoplasmàtics són aquells que es troben principalment en la substància gris, presenten unes prolongacions molt ramificades al voltant dels somes i dendrites neuronals i estan generats, principalment, per la glia radial en estadis embrionaris de la zona ventricular. En canvi, els astròcits fibrosos es troben en la substància blanca, presenten una menor quantitat de processos i ramificacions però amb prolongacions llargues i primes contactant amb els vasos sanguinis (peus astrocitaris) i es generen a partir de progenitors neonatals de la zona subventricular (Wang and Bordey, 2008). Existeix una gran heterogeneïtat entre els diferents tipus d'astròcits ja que s'han reconegut nombroses diferències anatòmiques entre astròcits de diferents regions (Hewett, 2009). Estudis d'expressió mitjançant *microarrays* mostren que hi ha pocs gens

expressats en tots els astròcits i que segurament es produeixen patrons d'expressió dependents de la localització cel·lular (Bachoo et al., 2004).

La unió entre astròcits es dona mitjançant unions de tipus *gap*, formant una estructura organitzada de manera de sinciti. Les unions *gap*, formades per proteïnes de la família de les connexines, són permeables a ions i permeten el flux de substrats energètics des dels vasos sanguinis fins a les neurones que es troben en el territori d'un astròcit (Simard et al., 2003). Cada membrana cel·lular contribueix amb un hemicanal, o connexó, a la unió *gap* (Abrams and Scherer, 2012; Nualart-Martí et al., 2013; Sargiannidou et al., 2010). Cada connexó està format per 6 connexines organitzades al voltant del porus central (**Figura 14**) i l'obertura de les connexines està altament regulada pel voltatge transmembrana, la fosforilació i la concentració de Ca^{2+} extracel·lular, entre d'altres processos (Goodenough and Paul, 2009; Lampe and Lau, 2000; Nualart-Martí et al., 2013). Els hemicanals individuals poden estar compostos per un sol tipus de connexina (homomèrics), o per diferents tipus (heteromèrics). Així doncs, les unions *gap* es poden formar per hemicanals iguals (hemotípic) o diferents (heterotípic). El major constituent d'aquests hemicanals astrocitaris és la connexina 43. Aquestes unions *gap* són generalment permeables a molècules més petites d'1 kDa com per exemple nucleòtids, vitamines, aminoàcids i ions (Sargiannidou et al., 2010).

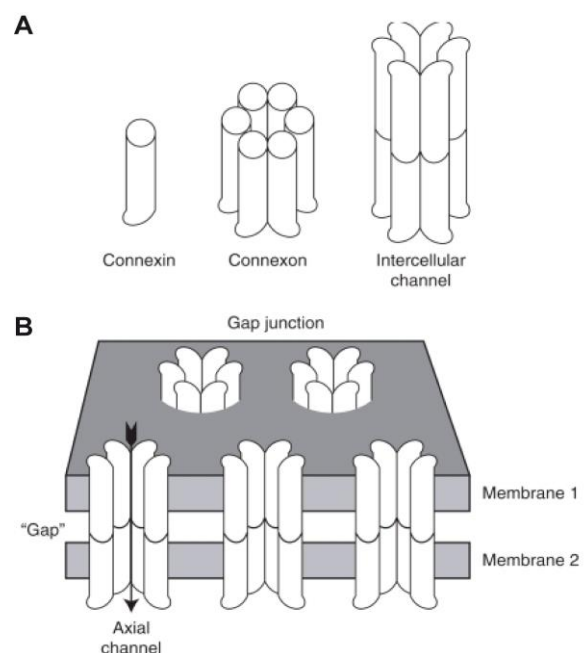


Figura 14. Diagrama dels múltiples nivells de l'estructura de la unió *gap*. (A) Connexines individuals s'uneixen intracel·lularment formant un hexàmer anomenat connexó que es dirigeix a la superfície cel·lular. (B) En la superfície cel·lular, s'acoba amb un altre connexó d'una cèl·lula adjacent, formant així un estret canal axial entre les dues membranes plasmàtiques.

Històricament, s'ha descrit els astròcits com "l'adhesiu" de les neurones en el cervell, però actualment es coneixen moltes i variades funcions. A part del seu paper clàssic de suport a les neurones, s'encarreguen del control de l'homeòstasi iònica i de l'aigua

del fluid extracel·lular, de la regulació del metabolisme energètic i de l'activitat sinàptica. A més a més, regulen els nivells de glutamat via transportadors com són GLT1 (EAAT-2) i GLAST (EAAT-1) en el cas dels astròcits que es troben en la glia de Bergmann, i GABA a les sinapsis. A més a més, s'encarreguen de la destoxicació d'amoni, del tamponament de la concentració extracel·lular de K^+ i la regulació del volum cel·lular i del pH. Tanmateix, proporcionen a les neurones de nutrients metabòlics i acoblen l'activitat sinàptica amb el flux sanguini local. També participen en el manteniment de la barrera hematoencefàlica i estan involucrats en la proliferació de cèl·lules mare, així com també són clau per l'extensió de les neurites i la migració axonal, participant també en la determinació del nombre de sinapsis. Un altre paper important que desenvolupen és el de protegir les neurones de l'estrès oxidatiu i propagar i modular les senyals excitatòries en el cervell per mitjà de l'alliberament de gliotransmissors (Benarroch, 2005; Blackburn et al., 2009; Oberheim et al., 2006).

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

MLC1, GlialCAM i CIC-2 són proteïnes astrocitàries i mutacions en MLC1 i GlialCAM donen lloc a la fisiopatologia MLC, produint-se una acumulació d'aigua en el cervell dels pacients. En el cas de CIC-2, recentment s'ha associat mutacions en aquest gen amb leucoencefalopaties vacuolitzants (Depienne et al., 2013). També s'ha descrit que hi ha una certa disminució de l'activitat VRAC en astròcits de rata en cultiu en els quals se'ls ha silenciats MLC1 (Capdevila-Nortes et al., 2013; Ridder et al., 2011). Per aquesta raó, en els següents apartats es desenvoluparà el paper dels astròcits en la regulació del volum cel·lular, en el tamponament de K^+ extracel·lular i la importància de la formació de xarxes glijals per al correcte manteniment de l'homeòstasi iònica.

3.1. REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR.

Les cèl·lules animals tenen un volum específic definit i característic per a cada tipus cel·lular. La membrana cel·lular és molt permeable i per això, qualsevol increment en l'osmolaritat intracel·lular com per exemple durant el transport transepitelial, una acumulació d'osmòlits o una reducció de l'osmolaritat extracel·lular, poden donar lloc a un canvi en el volum cel·lular per intentar restablir l'equilibri osmòtic.

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

Una cèl·lula pot presentar dos tipus d'inflament en funció de les condicions en què es troba. En primer lloc, l'inflament hipoosmòtic es dona com a conseqüència de la reducció externa d'osmòlits (condicions hipoosmòtiques del medi extracel·lular) i en segon lloc, l'inflament isosmòtic que es produeix com a conseqüència de canvis en la distribució intracel·lular d'osmòlits en condicions d'osmolaritat externa constant. Aquest segon tipus d'inflament es sol manifestar en situacions de fallada energètica com per exemple, en cas d'isquèmia o d'hipòxia. Molts tipus cel·lulars disposen de mecanismes de recuperació del volum per respondre a l'inflament hipoosmòtic. Aquests processos s'anomena *regulatory volume decrease* (RVD) i s'encarrega principalment de la mobilització de diferents soluts acompanyats d'aigua. Els osmòlits encarregats del reajustament del volum són el K^+ i el Cl^- , ja que són els ions intracel·lulars més abundants juntament amb molècules orgàniques. En el cas del procés de RVD generat per condicions d'inflament isosmòtic no es coneixen les seves particularitats.

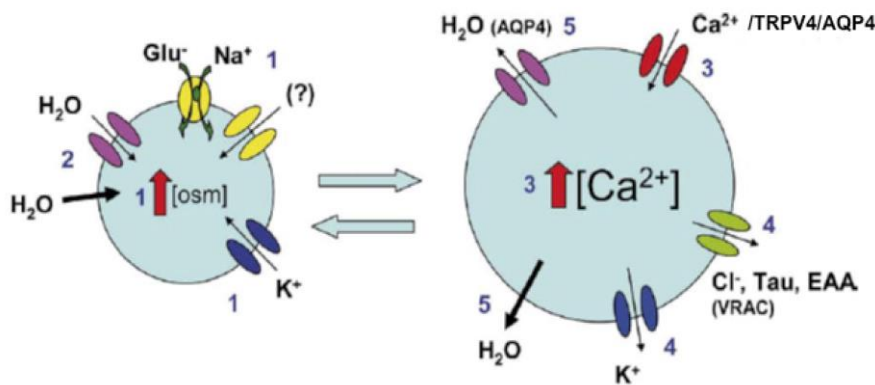
D'altra banda, també es pot donar una disminució del volum cel·lular com a conseqüència d'una hiperosmolaritat del medi extracel·lular que provoqui un encorgiment de la cèl·lula. El procés de resposta a aquestes condicions s'anomena *regulatory volume increase* (RVI) i implica l'acumulació d'ions essencials ($Na^+/K^+/Cl^-$) i de transportadors específics d'aminoàcids i polialcohols que actuen d'osmòlits (Jayakumar and Norenberg, 2010; Jayakumar et al., 2011; Kimelberg et al., 2006; Pasantés-Morales et al., 2006).

3.1.1. Regulació del volum en astròcits.

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

L'augment del volum cel·lular és més predominant en astròcits que en neurones. Els astròcits són altament permeables a l'aigua i aquesta flueix a través de la membrana dirigida pel gradient de pressió osmòtica o afavorida bidireccionalment per la presència

d'aquoporines, en aquest cas per l'AQP4. L'AQP4 és un canal d'aigua que es troba localitzats en els peus dels astròcits perivasculars i subpials. El seu extrem C-terminal està ancorat a la α -sintrofina, una proteïna adaptadora associada amb la distrofina, permetent un flux bidireccional entre el cervell i la sang (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003). Així doncs, l'AQP4 juntament amb transportadors i canals iònics, són les molècules implicades en l'augment del volum cel·lular astrocitari i en el mecanisme associat de RVD (Kimelberg et al., 2006).



- 1) Augment de la concentració intracel·lular d'osmòlits.
- 2) Entrada d'aigua i inflament de la cèl·lula.
- 3) Percepció de l'augment de volum i osmotransducció.
- 4) Sortida d'osmòlits orgànics i inorgànics.
- 5) Sortida d'aigua i recuperació del volum cel·lular.

Figura 15. Inflament astroglial i possibles vies de recuperació del volum cel·lular durant el mecanisme RVD. (1) En els peus astrocitaris, el K^+ , el Na^+ i el glutamat són captats per l'astròcit mitjançant el canal Kir4.1, els cotransportadors Na/Glu i poster per algun altre canal catiónic desconegut. **(2)** L'increment de la concentració intracel·lular d'osmòlits ve acompanyat d'una entrada d'aigua per difusió passiva i pel canal AQP4. **(3)** El mecanisme que percep l'augment és el RVD (*regulatory volume decrease*). L'augment de Ca^{2+} intracel·lular induït per l'inflament cel·lular podria estar implicat en l'osmotransducció. També s'ha suggerit que el complex TRPV4/AQP4 estigui implicat en aquest procés. **(4) i (5)** El procés RVD es basa en l'extrusió de soluts intracel·lulars juntament amb la sortida d'aigua. Els canals VRAC tenen un paper crític en el mecanisme de RVD, permetent la sortida de Cl^- , taurina (Tau) i aminoàcids excitatoris (EAA) com l'aspartat i glutamat. També es requereix una sortida de K^+ , però encara no s'ha identificat el canal de K^+ sensible a volum implicat. No s'ha inclòs bombes i transportadors que contribueixen al moviment d'ions a través de la membrana. Imatge adaptada de (Benfenati and Ferroni, 2010).

Estudis *in vitro* de l'exposició dels astròcits a condicions d'hipotonicitat ha permès avançar en el coneixement del mecanisme RVD (Benfenati and Ferroni, 2010). Aquest procés es pot dividir en tres etapes diferents:

1. Es forma un gradient d'osmolaritat intracel·lular el qual causa un inflament cel·lular degut a l'entrada d'aigua per difusió a través del canal AQP4.

2. L'astròcit percep un canvi de volum i genera una cadena de reaccions bioquímiques amb l'objectiu de recuperar l'homeòstasi i el volum cel·lular.
3. Els mecanismes efectors d'osmotransducció promouen l'alliberació d'osmòlits orgànics, inorgànics i aigua, per tal de recuperar el correcte volum cel·lular.

Fins al moment no està del tot clar quines són les molècules que actuen de sensors detectant els canvis de volum. S'ha suggerit que en els mecanismes de percepció de canvi de volum hi estan implicades proteïnes transmembrana com les integrines, receptors amb activitat quinasa (TKRs), receptors acoblats a proteïna-G (GPCRs) o canals de receptors potencials (TRPCs) (Pasantés-Morales et al., 2006). Un cop activades per hiposmolaritats, aquestes proteïnes modifiquen les condicions intracel·lulars com per exemple la reorganització del citoesquelet o l'augment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular. Aquestes característiques juntament amb la dilució de les macromolècules citosòliques o la disminució de la força iònica com a conseqüència de l'entrada d'aigua, actuen com a senyals cel·lulars per detectar canvis en el volum (Benfenati and Ferroni, 2010). Els subtipus 1 i 4 dels canals TRPC han estat identificats en cultius d'astròcits i s'ha suggerit que TRPC4 podria colocalitzar amb ZO-1 mitjançant el domini PDZ, el qual està controlant la seva localització en la superfície cel·lular (Malarkey et al., 2008; Song et al., 2005).

També s'ha relacionat altres canals catiònics no selectius com per exemple el subgrup de la família TRP anomenat TRPV (*transient receptor potential vanilloid related*). Aquest canals responen a una varietat d'estímuls físics i químics, juntament amb alteracions del volum cel·lular. En cèl·lules de mamífer s'ha implicat els canals TRPV1, TRPV2 i TRPV4 en la percepció i en mecanismes de transducció dels estímuls osmòtics. Més concretament, TRPV4 s'ha descrit com el canal involucrat en l'homeòstasi del volum cel·lular i en el procés RVD en varis tipus cel·lulars incloent astròcits corticals de rata (Becker et al., 2005, 2009; Benfenati et al., 2007a; Liu et al., 2006; Pan et al., 2008). TRPV4 s'expressa en les membranes astrocitàries terminals en contacte amb els vasos sanguinis, on també s'expressa en abundància AQP4. S'ha suggerit que el complex AQP4 i el canal TRPV4 constitueixen un element clau en l'homeòstasi del volum cerebral, ja que funcionen com a osmosensor acoblant l'estrès osmòtic a les cascades de senyalització cel·lular i així s'estaria connectant el sensor de senyal amb el mecanisme de resposta (Benfenati et al., 2011).

Totes aquestes proteïnes actuen com a sensors de canvis en el volum cel·lular, activant una sèrie de vies de senyalització involucrades en la reorganització del citoesquelet i en la supervivència cel·lular. Aquesta cascada de senyalització modula

els fluxos de Cl^- i K^+ regulats per volum i la sortida d'osmòlits orgànics a per mitjà del procés RVD (Vázquez-Juárez et al., 2008).

Els osmòlits implicats en la regulació del volum són tant ions inorgànics com petites molècules orgàniques, d'entre les qual inclouen sucres, aminoàcids, polialcohols i metilamines. L'expulsió o l'entrada d'aquests ions i molècules orgàniques són els mecanismes més ràpids per contrarestar els canvis de volum. En el mecanisme de RVD per contrarestar l'augment del volum cel·lular, existeix una sortida predominant d'ions intracel·lulars més abundants (Cl^- i K^+) i d'osmòlits orgànics com els aminoàcids excitatoris glutamat i aspartat, juntament amb taurina i ATP (Kimmelberg et al., 2006; Pasantes-Morales et al., 2006).

En el cas dels osmòlits orgànics s'ha proposat que el flux de sortida en resposta als canvis de volum s'efectua a través de l'activitat dels canals VSOAC (*volume sensitive organic anions channels*). Aquesta activitat s'activa en condicions d'hiposmolaritat i en concentracions altes de K^+ i depèn de calmodulina i de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Kimmelberg et al., 2006).

Per altra banda, en el cas dels ions inorgànics, s'ha diferenciat mecanismes de sortida de K^+ i de Cl^- específics per a cada ió en resposta a l'augment del volum cel·lular. En el cas del Cl^- s'ha demostrat que el canal de Cl^- *inwardly rectifying* Cl^- CIC-2 podria estar contribuint en l'homeòstasi del volum (Ferroni et al., 1997; Makara et al., 2003). També 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 (Kimmelberg et al., 2006). En astròcits en cultiu, l'augment del volum cel·lular activa les corrents 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 (Kimmelberg et al., 1990). A més a més, estudis *in vitro* han mostrat evidències d'una interacció funcional entre AQP4 i VRAC, ja que mitjançant miRNA de AQP4 en que es disminueix l'expressió, s'ha observat que l'activitat VRAC també es troba disminuïda (Benfenati et al., 2007b). En el cas del K^+ existeixen evidències que el flux d'ions K^+ és important en el procés de RVD, tot i que no s'han identificat quins canals són els implicats (Benfenati and Ferroni, 2010). Per exemple, el canal de K^+ Kir4.1 és essencial per la regulació de l'augment de volum cel·lular als peus astrocitaris terminals en la medul·la espinal, però encara no existeixen evidències d'aquest mecanisme en altres regions del SNC (Dibaj et al., 2007).

El mecanisme RVI té lloc quan hi ha una disminució del volum cel·lular associat a hiperosmolaritat. En aquest mecanisme estan implicats el cotransportador NKCC i els

intercanviadors Na^+/H^+ i el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. NKCC1 és un transportador que principalment s'ocupa del manteniment intracel·lular de Na^+ , K^+ i Cl^- . Les seves principals funcions són la de contribuir en el mecanisme RVI després d'un xoc hipoosmòtic i la participació en la captació de K^+ de l'espai extracel·lular durant els períodes d'activitat neuronal (MacVicar et al., 2002) però recentment s'ha descrit que en hipocamp de rata, NKCC1 no contribueix a l'eliminació de K^+ extracel·lular durant l'activitat neuronal sinó que el contribuent clau sembla ser la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$. Així doncs, podria ser que els mecanismes fossin diferents en funció de la regió (Larsen et al., 2014). S'ha identificat també que l'activitat de NKCC1 augmenta després d'un trauma en astròcits en cultiu i el bloqueig químic de l'activitat del canal o la silenciació de l'expressió mitjançant miRNA provoca l'atenuació d'aquest augment de volum induït (Jayakumar et al., 2011). En base a aquests fets, s'ha suggerit que el bloqueig de l'activitat del transportador NKCC1 podria representar una estratègia terapèutica útil per al tractament de les primeres fases del dany cerebral traumàtic.

3.1.1.1. Activitat VRAC i la seva implicació en el RVD astrocitari.

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

El canal VRAC presenta la següent permeabilitat iònica: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{gluconat}$. A part, VRAC proporciona una sortida d'osmòlits orgànics com aminoàcids (glutamat, aspartat i glicina) i polialcohols. A part, VRAC també té certa permeabilitat al lactat i al bicarbonat (Nilius and Droogmans, 2003). Fins al moment, s'havien proposat diversos candidats per a la modulació d'aquestes corrents regulades per VRAC, com per exemple la glicoproteïna-P, CIC-2, CIC-3 o Bestrofina-1, els quals posteriorment s'han descartat.

Tot i les controvèrsies al respecte, s'ha suggerit altres noms per l'activitat VRAC, com VSOR (*volume-sensitive outwardly rectifying anion channel*) i VSOAC (*volume-sensitive organic osmolyte anion channel*) per la capacitat de mostrar una activació

variable a potencials positius i per la capacitat de promoure fluxos d'osmòlits orgànics com la taurina (Okada, 1997; Okada et al., 2009).

A banda de tenir un paper important en la regulació del volum, VRAC també està implicat en l'exocitosi induïda per l'inflament cel·lular, per la regulació del cicle cel·lular, en la proliferació, migració, apoptosi i en diferents estadis patològics com poden ser la isquèmia, l'edema cerebral i el càncer (Moser et al., 1995; Nilius et al., 1997; Okada et al., 2006, 2009).

Recentment, s'ha descrit la proteïna LRRC8A (també anomenada AGM5 i SWELL1) com a component essencial per a la modulació de les corrents VRAC (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). La família de les proteïnes LRCC8 (*leucine-rich repeat containig 8*) consta de 5 paràlegs trobats en diferents cordats els qual s'anomenen LRRC8 A, B, C, D i E (Abascal and Zardoya, 2012). Aquesta família de proteïnes es va descobrir l'any 2003 i fins el moment es desconeixen les seves funcions biològiques en exactitud (Sawada et al., 2003). Estructuralment, consten de 4 segments transmembrana i un domini ric en leucines (LRR) situat a l'extrem C-terminal. Aquests dominis LRR tenen una estructura en forma d'arc amb una superfície elevada en relació al volum relatiu de les proteïnes globulars. S'ha suggerit que aquestes proteïnes podrien estar involucrades en la interacció entre proteïnes per mitjà dels dominis LRR, en processos d'immunitat innata, en el desenvolupament neuronal i en l'apoptosis (Kobe and Kajava, 2001; Padmanabhan et al., 2009).

S'ha descrit que les proteïnes LRRC8 podrien haver-se originat a partir de la combinació evolutiva entre una pannexina i alguna proteïna que contingui el domini LRR. Les pannexines són un grup de proteïnes que formen unions *gap* en vertebrats i presenten una baixa homologia amb les innexines, proteïnes encarregades de formar unions *gap* en invertebrats. Tot i que les pannexines formin hemicanals com les connexines i que un dels membres d'aquesta família, Panx1, mostri propietats similars a les connexines, s'ha demostrat mitjançant alineacions, que formen part de famílies de proteïnes clarament diferenciades (Bruzzone et al., 2003; Iglesias et al., 2009; Scemes et al., 2009). Tot i que s'han identificat moltes insercions i delecions comparant les seqüències de LRRC8 i les pannexines, existeixen alguns motius (un parell de cisteïnes en els *loops* extracel·lulars) ben conservats en les regions transmembrana de les dues famílies de proteïnes, principalment en els passos transmembrana 1 i 2 i en els *loops* (**Figura 16**) (Abascal and Zardoya, 2012).

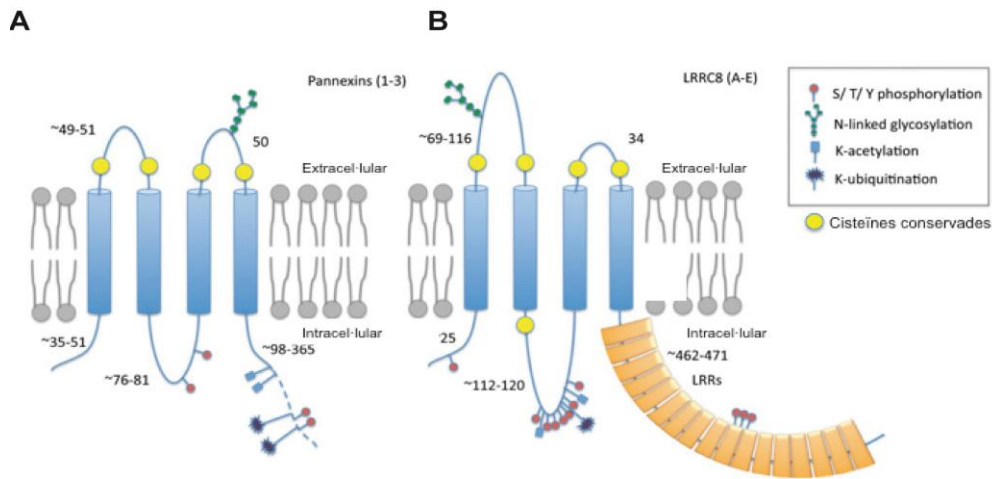


Figura 16. Topologia proposada i modificacions post-traduccionals de les pannexines (A) i de les LRRC8 (B). S'observen les diferents modificacions post-traduccionals (fosforilació, glicosilació, acetilació o ubiquitinació). Es mostren les cisteïnes conservades en els *loops* extracel·lulars (en groc)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

S'ha suggerit que les proteïnes LRRC8 podrien estar involucrades en la comunicació cel·lular, especialment en el SNC i en el sistema immune. Mitjançant un patró d'expressió gènica en teixits i en diferents tipus cel·lulars s'observa que els gens *LRRC8A* i *LRRC8D* s'expressen de manera ubiqüa però que *LRRC8B* seria específic del SNC i que *LRRC8C* estaria fortament lligat al sistema immune. L'expressió de *LRRC8E* és limitada però augmentaria la seva expressió en alguns tumors (Abascal and Zardoya, 2012). L'abundant presència de les proteïnes LRRC8 en macròfags i limfòcits podria suggerir el paper d'aquestes proteïnes en l'activació de cèl·lules immunes per senyals d'entrada.

Estudis de fluorescència per hipotonicitat induïda per l'entrada de I⁻ en cèl·lules HEK va mostrar com una truncació a l'extrem C-terminal d'LRCC8A provoca que es quedi retinguda intracel·lularment (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). Aquesta truncació s'ha observat en un pacient amb agammaglobulinèmia (Sawada et al., 2003). A part, s'ha demostrat que mutacions en LRRC8 causen canvis significatius en les propietats del porus, especialment en la selectivitat iònica a I⁻ respecte Cl⁻ (Qiu et al., 2014).

Tot i que un dels estudis conclou que LRRC8A és el component essencial de VRAC (Qiu et al., 2014), un altre estudi explica que LRRC8A hauria d'agafar una conformació hexamèrica amb mínimament alguna de les altres proteïnes LRRC8 per donar lloc a l'activitat VRAC (Voss et al., 2014). En aquest treball també es suggereix que l'activitat VRAC de LRRC8 és la mateixa que l'activitat VSOAC. Altres estudis mostren com el model *knock-down* de LRRC8A provoca l'eliminació completa de l'alliberament d'aspartat i taurina induït per ATP, indicant l'important involucrament de VRAC en

l'alliberament d'EAA i d'altres glicotransmissors citosòlics induït per agonistes en cèl·lules gials (Hydzinski-García et al., 2014). Aquests resultats obren una porta per a estudiar la contribució relativa de LRRC8A i altres membres de la mateixa família en la comunicació bidireccional entre l'astròcit i la neurona mitjançant l'ús de miRNA.

3.2. TAMPONAMENT DEL K^+ EXTRACEL·LULAR.

L'activitat neuronal genera un augment de la concentració extracel·lular de K^+ i per tant, la regulació d'aquest augment és vital per al correcte funcionament neuronal. Si no es realitza una correcta regulació del K^+ extracel·lular, aquest pot alterar l'excitabilitat neuronal, l'alliberació de neurotransmissors, el metabolisme de la glucosa i el reg sanguini cerebral (Theodosis et al., 2008). El cervell està preparat per resistir concentracions de K^+ de 2-3 mM (Moghaddam and Adams, 1987) però poden augmentar fins a 10-12 mM després de l'estimulació elèctrica fins a 80 mM en condicions patològiques

Existeixen principalment dos mecanisme de tamponament de potassi en astròcits: el tamponament espacial de potassi (*potassium siphoning*), que depèn de la xarxa astrocitària i l'absorció de potassi extracel·lular (Benarroch, 2005; Kofuji and Newman, 2004).

3.2.1. Tamponament espacial de K^+ o *potassium siphoning*.

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

Els astròcits expressen múltiples canals de K^+ d'entre els quals destaca particularment el canal *inward rectifying Kir4.1* ja que s'ha demostrat que en aquest canal es detecta la majoria de la conductància astrocítica (Butt and Kalsi, 2006; Olsen et al., 2006). Aquest canal s'expressa en astròcits, oligodendròcits, en la glia de Bergmann i en la glia de Müller (Kalsi et al., 2004). A nivell cel·lular, s'expressa tant a nivell de les sinapsis com als peus astrocitaris rodejant els capil·lars i degut a la dèbil rectificació que presenta, permet el moviment bidireccional de K^+ en funció del gradient de K^+

transmembrana. Gràcies a aquest canal, entre d'altres, els astròcits transfereixen el K^+ des d'on es troba acumulat fins a les regions amb una menor concentració per finalment abocar-lo als vasos sanguinis. Aquest procés es realitza per mitjà d'un flux de corrent a través de la xarxa glial, el qual pot ser reversible. Kir4.1 presenta un motiu PDZ en el seu extrem C-terminal amb el qual pot formar interaccions entre proteïnes que també presentin aquest motiu. Per exemple, Kir4.1 colocalitza en els peus astrocitaris per mitjà d'aquest motiu amb sintrofina, proteïna associada al complex glicoproteic associat a distrofina (DGC) (Benfenati and Ferroni, 2010).

En els peus astrocitaris, Kir4.1 es troba coexpressat amb AQP4. S'havia suggerit que AQP4 podria estar facilitant el moviment d'aigua a través de la membrana, cooperant amb Kir4.1 amb el moviment de K^+ (Nagelhus et al., 2004). A banda, també s'ha suggerit que AQP4 regula la dinàmica del volum de l'espai extracel·lular en el cervell (Haj-Yasein et al., 2012). L'AQP4 també colocalitza amb les proteïnes formadores del DGC. Per a que l'AQP4 pugui realitzar la seva funció necessita estar anclada a la sintrofina ja que el model *knock-out* de sintrofina mostra la pèrdua de la proteïna AQP4 en la membrana perivascular dels peus astrocitaris i els animals presenten un retard en el tamponament de K^+ extracel·lular, fet que provoca una activitat neuronal sostinguda. Aquest animal deficient en sintrofina mostra inalterada la proteïna Kir4.1 i les seves propietats funcionals, de la mateixa manera que s'observa en el *knock-out* d'AQP4. Aquests resultats, a diferència del que es suposava fins al moment, implicarien que Kir4.1 i AQP4 no presenten una interacció funcional (Zhang and Verkman, 2008). Una possible explicació per a aquest fet podria ser que aquestes dues proteïnes no pertanyin al mateix microdomini de la membrana plasmàtica. Donat que els astròcits poden ser considerats com una unitat multifuncional, s'ha hipotetitzat que el canal Kir4.1 podria presentar diverses funcions depenent de la regió on s'expressi, per exemple podria realitzar una funció característica al localitzar-se en els peus astrocitaris rodejant els vasos sanguinis mentre que realitzaria una funció diferent quan es localitzés prop de les sinapsis (Benfenati and Ferroni, 2010). S'ha mostrat que tot i no presentar un paper predominant en l'absorció de K^+ , Kir4.1 sí que és essencial per a un eficient tamponament d'aquest (Chever et al., 2010).

La correcta formació de les xarxes glijals mitjançant les unions *gap* són essencials per al *potassium siphoning* ja que gràcies a aquestes connexions hi pot tenir lloc el transport d'ions. Els astròcits expressen principalment la Cx43, però també expressen Cx30 i Cx26 (Nagy et al., 2004). La implicació de les unions *gap* en la modulació del *potassium siphoning* es va mostrar primerament en un treball realitzat en un doble *knock-out* de Cx30 i Cx43 (Wallraff et al., 2006). S'ha observat també que l'augment

de la concentració de K^+ extracel·lular a causa d'una alta activitat neuronal, per exemple durant una isquèmia, provoca un augment dels nivells d'expressió tant d'AQP4 com de Cx43 (Ribeiro et al., 2006). Una altra prova directe de la relació entre AQP4 i Cx43 s'ha obtingut en astròcits de ratolí, on disminuint l'expressió d'AQP4 mitjançant miRNA s'observa una disminució de l'expressió de Cx43 juntament amb una disminució de la capacitat d'acoblament cèl·lula-cèl·lula (Nicchia et al., 2005). Per altra banda, s'ha mostrat que les connexines oligodendrocítiques, Cx32 i Cx47, i el canal Kir4.1 actuen en la mateixa via de regulació del *potassium siphoning* durant l'activitat axonal. Els estudis efectuats en dobles *knock-out* de Cx32 i Cx47 mostren vacuolització de les zones mielinitzades igual que succeeix en el ratolí *knock-out* de Kir4.1 (Menichella et al., 2006).

3.2.2. Absorció de K^+ .

Fins al moment, s'ha descrit que l'absorció de K^+ en les cèl·lules glials es realitza a través de la bomba $Na^+K^+ATPasa$ i del cotransportador $N^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC1). Aquesta absorció genera un desequilibri de càrregues que s'ha de contrarestar principalment amb l'entrada paral·lela d'ions Cl^- . Aquesta entrada de Cl^- pot venir a través de canals específics de Cl^- , o a través de la seva recaptació conjunta amb el K^+ mitjançant el cotransportador NKCC.

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

per tant tingués una contribució en l'homeòstasi de l'aigua i del K^+ (Larsen et al., 2014).

Tots els mecanismes de tamponament del potassi extracel·lular, ja sigui per difusió, *potassium siphoning* i/o per l'entrada de K^+ en associació amb el Cl^- a través dels canals de Cl^- o de NKCC, tenen l'avantatge que no requereixen una despesa energètica per a les cèl·lules glials i que són mecanismes reversibles quan la concentració extracel·lular de K^+ es redueix degut a la reabsorció neuronal. El *potassium siphoning* és el mecanisme principal durant l'activitat fisiològica normal, en canvi, sota condicions patològiques la reabsorció del K^+ és el mecanisme que té una major contribució. No obstant, l'absorció de K^+ juntament amb Cl^- té la contrapartida de causar l'inflament cel·lular, i aquest pot derivar en la formació d'un edema, on seria clau l'activitat de la bomba $Na^+K^+ATPasa$.

3.3. FORMACIÓ DE XARXES GLIALS.

Les cèl·lules glials s'uneixen les unes amb les altres per constituir una xarxa que primerament va ser anomenada "sinciti panglial" (Nagy et al., 2004). Els components principals d'aquesta xarxa glial són els astròcits i els oligodendròcits. Aquestes cèl·lules estan interconnectades a través d'unions *gap* (Fischer and Kettenmann, 1985; Nedergaard et al., 2003). Aquest tipus de xarxes, especialment la que es troba formada per astròcits i oligodendròcits, s'estén radialment des del canal espinal i els ventricles cerebrals fins la glia que envolta l'epiteli vascular, passant per regions de la substància blanca i gris (Rash, 2010; Rash et al., 1997). S'ha suggerit que entre els astròcits i les neurones es pot establir una comunicació directa per mitjà de canals intracel·lulars, a partir de la qual podrien proporcionar algun altre mecanisme per a la regulació glial durant l'activitat neuronal (Alvarez-Maubecin et al., 2000; Nedergaard, 1994).

Aquesta xarxa glial juga un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi, el pH extracel·lular i els nivells de K^+ i glutamat, i també indirectament en la pressió vascular, la sinapsi neuronal i el tràfic de glucosa des dels vasos a les neurones. A partir d'aquestes funcions de comunicació, les unions *gap* també tenen un paper important en la morfologia cel·lular i en l'organització del citoesquelet (Yamane et al., 2002).

Els astròcits expressen tres tipus de connexines, la Cx43, que és la més abundant, la Cx30 i la Cx26 (Nagy et al., 2004). Aquests tres tipus de connexines mostren diferents patrons d'expressió (Altevogt and Paul, 2004) i colocalitzen en les unions *gap* astrocitàries. Les unions *gap* entre astròcits solen ser homodimèriques, compostes per

Cx43/Cx43, les quals es solen localitzar tant en la substància gris com en la blanca, i la Cx30/Cx30 les quals predominen en la substància gris (Altevogt and Paul, 2004; Rash et al., 2001).

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

La importància funcional de les connexines es demostra amb els diferents models animals. El ratolí *knock-out* de Cx43/Cx30 és letal en estadis embrionaris i el doble *knock-out* Cx32/C47 i Cx47 mostren un fenotip vacuolitzant a nivells de la mielina, principalment en el doble *knock-out* ja que la vacuolització s'observa a partir del dia postnatal 13 (Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003). S'han identificat mutacions en els gens que codifiquen per diferents connexines que també resulten en diferents malalties com per exemple el cas de la malaltia Charcot-Marie-Tooth lligada al cromosoma X en què es troba mutada la Cx32 (Yum et al., 2002). S'ha descrit també que mutacions en el gen que codifica per la Cx43 astrocitària dona lloc a displàsia oculodentodigital, on els pacients mostren desmielinització (Sargiannidou et al., 2010).

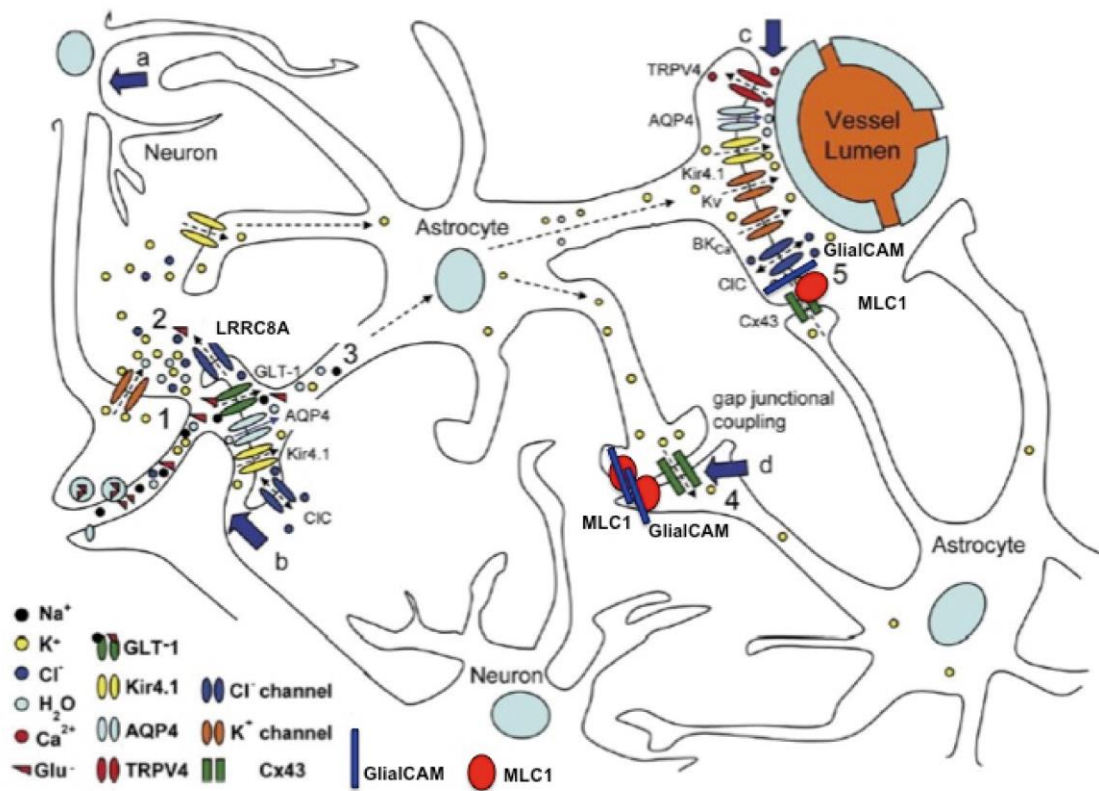


Figura 17. Resum dels mecanismes astroglials implicats en l'homeòstasi extracel·lular. La morfologia astrocitària en el cervell es caracteritza per un cos cel·lular irregular que genera diferents processos. Aquests processos poden contactar amb el soma neuronal (a), envoltar les sinapsis (b) o envoltar els vasos sanguinis (c). Per la seva part, els astròcits estan connectats entre sí per unions *gap* (d) que permeten la sincronització de les respostes a les cèl·lules distals del sinciti astroglial. Aquesta arquitectura és fonamental per al manteniment de l'homeòstasi extracel·lular. (1) Com a resultat de l'activació d'un potencial d'acció s'alliberen neurotransmissors i ions a l'espai extracel·lular de la zona perineuronal. (2) Els astròcits recapten el potassi i el glutamat extracel·lular acumulat. (3) El glutamat és recaptat a través dels cotransportadors GLT-1 i GLAST, mentre que el potassi pot ser recaptat per diferents canals on el més important en la zona perineuronal és el canal Kir4.1. (4) L'excés de potassi intracel·lular és redistribuït espacialment via unions *gap* per tot el sinciti astrocitària fins que és abocat al corrent sanguini via Kir4.1 juntament amb l'activació d'altres canals com BKCa o Kv (5). Durant el procés de *potassium siphoning* es crea un gradient osmòtic que és contrarestat per un flux d'aigua. Aquest moviment osmòtic es realitza a través del canal AQP4 que s'expressa a les regions astrocitàries que envolten les sinapsis i als peus astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis. La concentració de Cl⁻ intracel·lular és clau per la regulació d'aquests processos on la contribució dels canals CLC en aquest procés encara no està clara. Per altra banda, les proteïnes LRRRC8 modulen l'activitat VRAC contribuint en el manteniment del volum cel·lular. Finalment, no es coneix clarament la funció del canal TRPV4 però es proposa que pot funcionar com a osmosensor de les condicions extracel·lulars del medi i activar els processos de control del volum cel·lular. Les bombes i transportadors que contribueixen als moviments transmembrana dels ions no han estat inclosos. S'han incorporat la localització de les proteïnes MLC1 i GliacAM al costat del canal de Cl⁻ en el cas dels peus astrocitaris que es troben situats al voltant dels vasos sanguinis i formant unions entre astròcits. Imatge modificada de (Benfenati and Ferroni, 2010).