

PART III

Introducció

Aquesta part del treball està dedicada específicament a la caracterització molecular del gen LRRN6A. LRRN6A va ser identificat durant l'aïllament i caracterització de cDNAs continguts a la regió 15q24-q26 dins el marc del projecte EuroImage, tal i com es descriu en els apartats anteriors (veure Part I i Part II). Les característiques a nivell de la seva seqüència aminoacídica, la predicció de dominis proteics, el seu patró d'expressió en teixit humà i murí adult, el patró d'expressió durant el desenvolupament i la similitud amb proteïnes amb funcions destacades en el manteniment i funcionament del sistema nerviós van impulsar una anàlisi més exhaustiva d'aquest gen. Aquesta part de la tesi es centra en un estudi més profund del gen LRRN6A. Es descriu i analitza la seva expressió durant el desenvolupament destacant la seva distribució quasi específica al sistema límbic en l'adult. Finalment, s'inclouen els resultats obtinguts dels primers estudis funcionals amb LERN1, la proteïna per a la qual codifica LRRN6A.

1. El sistema límbic

En termes d'estructura i composició química, el cervell és considerat un dels òrgans més complexos del cos humà. Aquesta complexitat és resultat de la composició gènica de l'individu, d'experiències vitals i de l'influència de l'ambient. El cervell adquireix, processa i distribueix informació donant lloc a capacitats com l'aprenentatge, el comportament, els sentiments o les sensacions. Per tal que aquests processos tinguin lloc és necessari que la comunicació entre els milions de cèl·lules que componen aquest òrgan sigui efectiva i correcta. S'ocasionen disfuncions cerebrals i malalties mentals quan es produeixen errors o alteracions en aquestes vies.

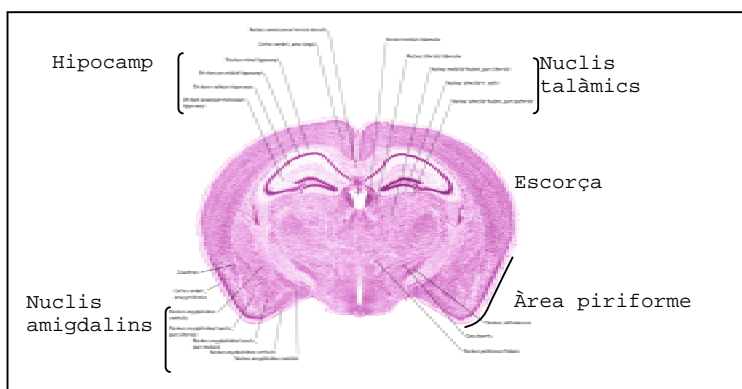


Figura 7. Localització de les estructures principals del sistema límbic en un tall coronal de cervell murí.

L'elevada complexitat del sistema nerviós central dels vertebrats i les limitacions actuals del nostre nivell de coneixement comporten que els criteris actuals de simptomatologia rellevant per al diagnòstic de moltes malalties mentals sigui heterogènia, diversa i en molts casos redundant i compartida entre diferents escoles de diagnòstic. La distinció dins d'un continu, entre trastorns d'ansietat com el pànic, la fòbia social, l'agorafòbia, els trastorns obsessivo-compulsius, l'ansietat generalitzada o el trastorn per estrès post-traumàtic (DSM-IV) és un clar reflexe de la variabilitat present en aquest tipus d'alteracions.

Nombrosos estudis han implicat el sistema límbic en el control de les emocions, de les secrecions hormonals, de les motivacions, de l'integració de la memòria recent i en les sensacions com la por, el dolor o el plaer. El sistema límbic és un conjunt d'estructures cerebrals interrelacionades que inclou l'escorça entorrinal o piriforme, l'hipocamp, el tàlem, l'hipotàlem i l'amígdala (Figura 7). Precisament, l'amígdala és l'estructura cerebral més destacada quan es fa referència a alteracions com el pànic o l'ansietat. L'amígdala es troba localitzada internament a nivell del lòbul temporal i ha estat directament implicada en respostes d'estrès, emotivitat i autopreservació de l'individu. L'amígdala rep informació des de l'escorça frontal, des del escorça associativa, des del lòbul temporal i des d'altres parts del sistema límbic. Algunes fibres aferents des de l'amígdala es dirigeixen a l'escorça frontal i prefrontal, a l'hipotàlem, a l'hipocamp i a nuclis cerebrals com el *locus coeruleus* o el nucli de rafe. Precisament es tracta d'àrees que controlen processos fisiològics com la respiració, la funció motora, la resposta autònoma, l'alliberament d'hormones i l'integració d'informació interna i externa (Figura 8). Diversos estudis han demostrat una implicació de l'amígdala en respostes molt similars a les reaccions produïdes durant un atac de pànic. Per una banda, l'estimulació directa de l'amígdala i l'hipocamp en humans ha produït les respostes típiques d'un atac de pànic (Halgren *et al.*, 1978). L'injecció de neurotransmissors excitadors en nuclis centrals de l'amígdala d'animals de laboratori ha donat lloc a respostes autònomes simpàtiques, les quals són característiques de la resposta pànico-ansiosa (Iwata *et al.*, 1987). De la mateixa manera, l'injecció de substàncies ansiolítiques a nivell de l'amígdala (les benzodiazepines per

exemple) ha produït respostes que es correlacionen perfectament amb la resposta ansiolítica obtinguda per aquests compostos en humans, revertint, per tant, l'efecte de l'atac de pànic (Hodges *et al.*, 1987).

Un element crucial en els processos de codificació i recuperació de l'informació sensorial és l'hipocamp (Figura 9). Nombroses alteracions neuropsiquiàtriques han estat associades amb anomalies estructurals o funcionals en neurones de l'hipocamp, entre les quals destaquen l'esquizofrènia, l'epilèpsia, la malaltia d'Alzheimer o alguns trastorns amnèsics (Halgren *et al.*, 1978; Heckers & Konradi, 2002; Isaacson, 1972). Diversos estudis han evidenciat el paper concret de l'hipocamp en la formació de records, en el que s'anomena memòria declarativa o memòria a llarg plaç (Lynch, 2004; Richter-Levin, 2004).

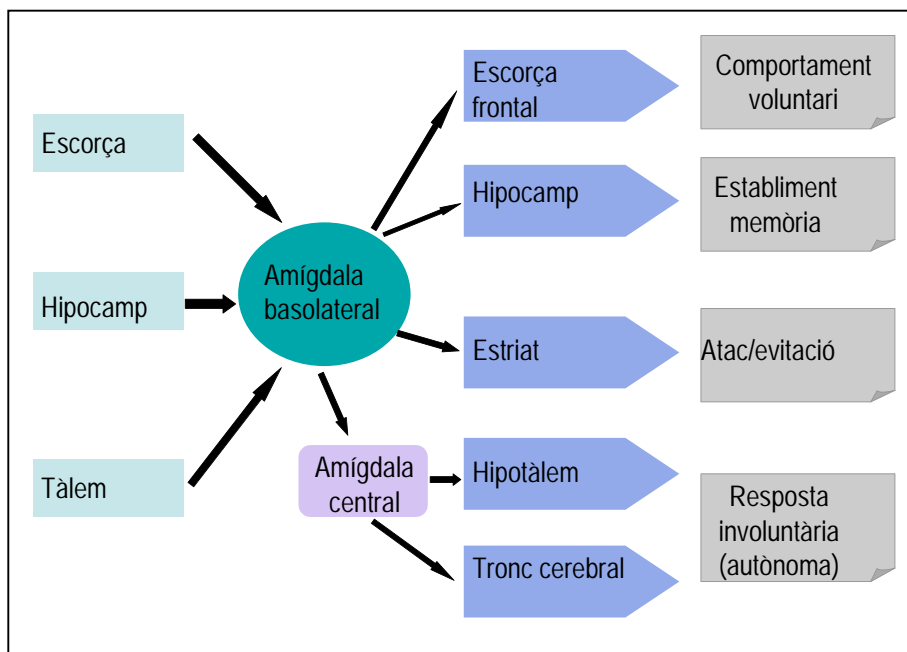


Figura 8. Estructures del sistema límbic, fluxe d'informació i efecte fisiològic associat. Adaptat de (Davis *et al.*, 2003)

El tàlem, considerat també component del sistema límbic, és el centre processador, coordinador i integrador de l'informació procedent de l'escorça (Figura 9). La seva implicació en els processos de percepció i consciència li otorga també un paper en l'expressió afectiva. Els nuclis que conformen el tàlem es localitzen al diencèfal intern. La lesió o estimulació de nuclis específics del tàlem s'ha associat a canvis en la reactivitat emocional, especialment a

variacions en les connexions d'aquests nuclis amb altres estructures del sistema límbic.

L'escorça entorrinal està localitzada a la superfície ventral del lòbul temporal (Insausti *et al.*, 1995), concretament per sota de l'amígdala i de l'hipocamp. Varis estudis han confirmat que l'escorça entorrinal és una estructura heterogènia pel que fa a la seva química, citologia i connectivitat (Insausti *et al.*, 1997). L'escorça entorrinal està en comunicació amb l'hipocamp i la resta de l'escorça o neocòrtex (Figura 9). Té una funció en el processament de l'informació des del neocòrtex cap a l'hipocamp i a la resta de l'escorça. Se li ha otorgat un paper en la transmissió del senyal i en el control del seu fluxe. L'implicació de l'escorça entorrinal en patologies s'ha evidenciat en el cas de la malaltia d'Alzheimer (Du *et al.*, 2004) i de l'epilèpsia del lòbul temporal (Du *et al.*, 1995).

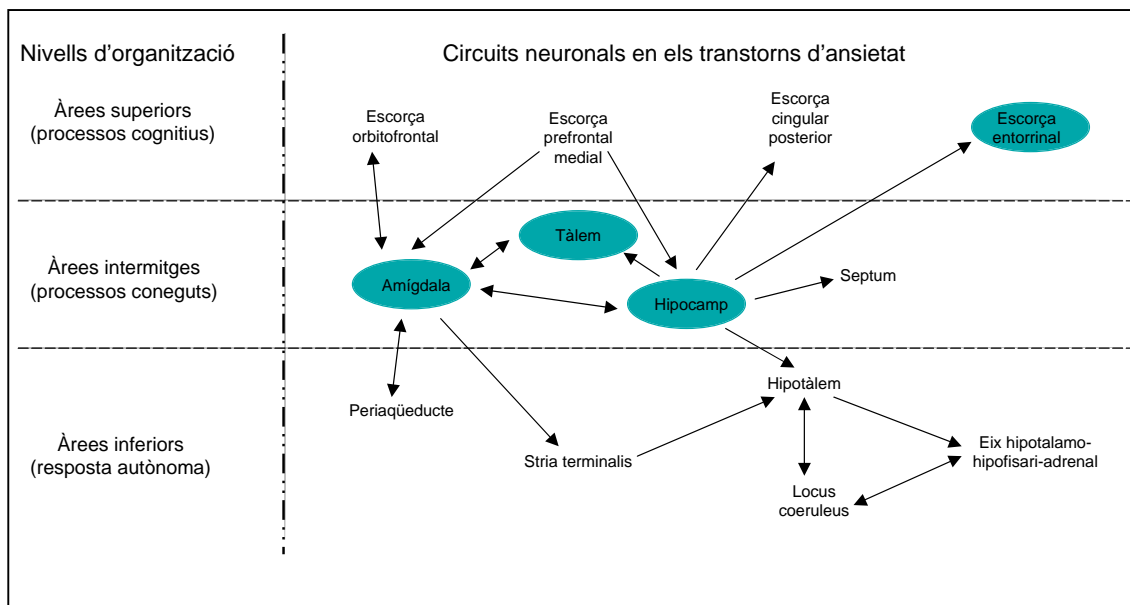


Figura 9. Estructures cerebrals amb implicacions en la resposta ansiosa i circuits de comunicació. Adaptat de (Finn *et al.*, 2003).

II. Gens candidats i models animals per als trastorns neurològics humans

Apart d'anàlisis recents que identifiquen regions com 7p15 o 9q com a potencials candidates per a trastorns de pànic, els estudis de lligament globals del genoma no han obtingut resultats concisos respecte a les regions responsables dels trastorns d'ansietat (Crowe *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 1998). Tot i així, alguns estudis d'associació i lligament han aconseguit

identificar gens o regions genòmiques rellevants per a trets particulars dels estats de pànic i ansietat. Diversos estudis han analitzat gens candidats en funció de les seves propietats neuroquímiques i potencial funció a nivell neurològic. És el cas dels enzims del metabolisme catecolaminèrgic (monoamino oxidasa A (MAOA) o catecol-O-metil transferasa (COMT)); els receptors de dopamina D2, D3, D4; els gens del sistema serotoninèrgic com el receptor 5-HT1B o el transportador de serotonina; les subunitats del receptor GABA-A; els receptors d'adenosina A1 i A2; i la colecistoquinina (CCK) (Lesch, 2001). En general però, els resultats obtinguts per aquests estudis mostren un grau d'inconsistència significatiu que suggereix la necessitat d'una replicació en altres poblacions, l'establiment de concordància entre fenotips i diagnòstic, i anàlisis d'associació utilitzant mostres de població més grans.

Els models murins de la simptomatologia dels trastorns d'ansietat estan basats en comportaments naturals interpretats com a "ansiosos". Molts dels models animals d'ansietat tenen alterats els seus comportaments naturals en situacions conflictives (exploració espontània, comportaments d'evitació), les respostes o comportaments apresos o una combinació de totes dues situacions. La validesa dels mètodes pot obtenir-se farmacològicament, específicament amb l'administració de substàncies ansiolítiques o ansiogèniques i la consegüent avaluació del comportament en el model estudiat. Els estudis amb línies mutants murines han detectat fenotips relacionats amb els trastorns d'ansietat per a gens de funció tan variada com el gen de la preproencefalina (Konig *et al.*, 1996), el neuropèptid Y (Inui *et al.*, 1998), l'interferó (Kustova *et al.*, 1998), el receptor D4 de la dopamina (Dulawa *et al.*, 1999), el receptor de glucocorticoids (Tronche *et al.*, 1999), l'isoforma α de la proteïna quinasa II dependent de calci/calmodulina (α CaMKII) (Chen *et al.*, 1994), la proteïna quinasa Cg (Bowers *et al.*, 2000), l'apolipoproteïna E (Raber *et al.*, 2000), les molècules d'adhesió neuronal (NCAM) (Stork *et al.*, 2000) o el gen de la distrofina (Vaillend & Ungerer, 1999). Per tant, esdevé clar que els trastorns d'ansietat poden aparèixer per anomalies en receptors, efectors intracel·lulars, proteïnes del citoesquelet o proteïnes de la matriu extracel·lular indicant que el funcionament normal dels processos d'ansietat requereix un funcionament normal dels circuits neuronals en general. El

principal desavantatge d'aquests estudis resideix en la naturalesa de la tecnologia per a generar els models animals, especialment els de pèrdua de funció o *knockouts* (sense tenir en compte patró d'expressió del gen, distribució temporal o tipus cel.lular afectat) i de les limitacions en la profunditat amb que s'han estudiat aquests models. Aquest fet comporta que molts d'aquests estudis disruptant la funció d'un determinat gen no obtinguin resultats concrets, específics i informatius. Per altra banda però, l'avantatge principal d'identificar potencials gens implicats en els trastorns d'ansietat en models animals com el ratolí permet usar el gen homòleg humà o la regió sintènica humana per a demostrar associació amb la malaltia en famílies afectades pel trastorn. Utilitzant aquest enfoc s'han publicat resultats de lligament per a trastorns d'ansietat amb el cromosoma 12 i amb el cromosoma 1 humans (Flint *et al.*, 1995; Talbot *et al.*, 1999; Turri *et al.*, 2001).

III. Els dominis rics en leucina (LRR) i els dominis immunoglobulina (Ig) en proteïnes del sistema nerviós

Els dominis rics en leucina (LRR) han estat identificats en nombroses proteïnes d'origen i funció molt diversa (Kobe & Kajava, 2001). Estan constituïts de 20 a 29 aminoàcids, amb una constància en la posició dels residus leucina i un esquelet carbonat variable entre diferents dominis LRR i entre famílies de proteïnes LRR. La gran majoria de proteïnes amb dominis LRR es troben en eucariotes (els presents a proteïnes procariotes presenten una estructura diferenciada) i tenen un paper en processos de reconeixement i interacció proteïna-proteïna (Buchanan & Gay, 1996; Kobe & Deisenhofer, 1994). Els residus, bàsicament leucines, conservats en els diferents dominis LRR donen lloc a una estructura en tres dimensions de tipus superhelical formant solenoids (Kajava *et al.*, 1995). Es postula que els residus menys conservats serien responsables de l'especificitat de les interaccions; aquests residus permeten distingir entre famílies de proteïnes LRR que reflecteixen històries evolutives independents (Kajava, 1998) (Taula 7 i Figura 10).

Amb la creixent disponibilitat de seqüència genòmica s'han pogut identificar més seqüències i gens que codifiquen per a proteïnes amb dominis LRR i es confirma la presència d'aquests dominis en proteïnes d'origen i funció molt diversa des de llevats i plantes fins a vertebrats. La majoria d'aquestes proteïnes

són eucariotes, tot i que el domini LRR s'ha descrit també en organismes procariotes i pràcticament totes elles semblen intervenir en processos de reconeixement proteïna-proteïna.

Taula 7. *Característiques d'alguns exemples de proteïnes LRR d'estructura tridimensional coneguda.*

Proteïna LRR	Organisme	Lligand	Funció	Nº de LRRs	Nºresidus / LRR	Referència
Dineïna LC1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	Interacció proteïna-proteïna	6	22-25	(Wu et al., 2000)
Skp2	<i>Homo sapiens</i>	Skp1	Ubiquitinització	10	23-27	(Schulman et al., 2000)
U2A'	<i>Homo sapiens</i>	U2B' snRNA	Splicing	5	22-26	(Price et al., 1998)

És destacable l'alt número de proteïnes amb dominis LRR que es troben expressades a nivell del sistema nerviós. Se n'han descrit amb funcions com a receptors de factors de creixement neuronal, com a molècules implicades en processos de guiatge i desenvolupament axonal o com a components de complexos d'adhesió (Taula 8).

Els receptors de neurotrofina amb activitat tirosina quinasa (NTRK1, 2, 3) constitueixen un exemple clàssic de proteïnes LRR de funció destacada al sistema nerviós (Huang & Reichardt, 2001). La unió de la neurotrofina al seu receptor inicia la transducció de senyals intracel·lulars implicades en la

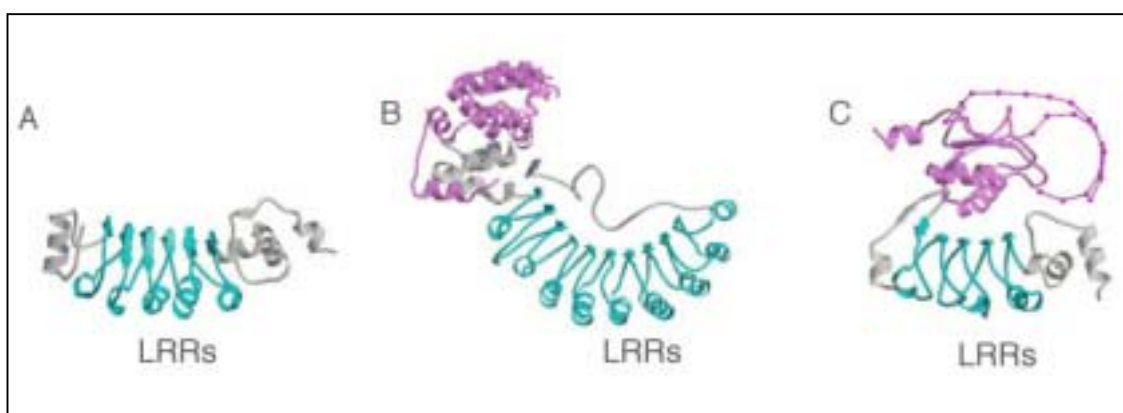


Figura 10. *Estructura tridimensional d'algunes proteïnes LRR. Els dominis LRR es mostren en blau, en gris els dominis flanquejants i en rosat les subunitats interaccionants. (A) cadena lleugera de la dineïna (LC1); (B) proteïna Skp2; (C) subunitat U2A' del complexe de splicing. Adaptat de (Kobe & Kajava, 2001).*

supervivència i manteniment neuronal de vertebrats durant els estadis embrionaris i postnatsals, durant el desenvolupament i diferenciació del sistema nerviós.

Les proteïnes de la família SLIT constitueixen també un típic exemple de proteïnes LRR amb funcions imprescindibles a nivell del desenvolupament i manteniment del sistema nerviós (Brose & Tessier-Lavigne, 2000; Li *et al.*, 1999). Estudis genètics en *Drosophila* van descobrir l'existència d'un sistema molecular de repulsió que impedeix als axons que es dirigeixin a regions no adients. Precisament aquest procés està mediat per les proteïnes SLIT i els seus receptors, Robo (Brose *et al.*, 1999). Homòlegs de SLIT es troben en pràcticament tots els vertebrats. Són glicoproteïnes de la matriu extracel·lular que es caracteritzen per posseir dominis LRR, repeticions EGF (epidermal growth factor) i un mòdul particular anomenat ALPS. S'ha descrit l'existència d'un procés de proteòlisi de SLIT2 en cultiu i *in vivo*. L'activitat de les proteïnes SLIT ha estat demostrada durant el desenvolupament dels axons de la medulla espinal, del gir dentat de l'hipocamp i de la retina (Nguyen-Ba-Charvet & Chedotal, 2002).

Els membres de la subfamília de proteïnes neuronals NLRR identificats fins aquest moment corresponen a molècules transmembrana riques en dominis d'interacció proteïna-proteïna a la seva regió extracel·lular com són els dominis LRR, els dominis immunoglobulina (IgC2) o els dominis fibronectina tipus III (FNIII) (Taguchi *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 1996). Un dels membres estudiats fins aquest moment, NLRR-3, presenta un increment d'expressió després d'una lesió traumàtica a l'escorça cerebral (Ishii *et al.*, 1996).

Les proteïnes SLITRK constitueixen una família de 6 membres identificats recentment a ratolí (Aruga & Mikoshiba, 2003). Es tracta de proteïnes transmembrana amb similitud als receptors de neurotrofina (NTRK1, 2, 3) i amb presència de dominis LRR extracel·lulars amb homologia significativa als dominis presents a SLIT. Estudis funcionals han implicat aquest grup de proteïnes en el control del desenvolupament de les neurites (Aruga & Mikoshiba, 2003). La seva expressió s'ha observat alterada en tumors cerebrals amb diferents graus d'especificitat respecte el tipus de tumor i patró d'expressió pels 6 membres de la família (Aruga *et al.*, 2003).

A mesura que els projectes genoma han permès detectar per homologia de seqüència membres de noves famílies LRR s'ha vist expandit el llistat i destaca el fet que els membres de cada grup, agrupats per la seva homologia de seqüència poden presentar perfils d'expressió complementaris o excloents entre ells. És el cas per exemple, de les proteïnes transmembrana amb dominis LRR (LRR-TMs). L'estructura i patró d'expressió d'aquestes proteïnes suggereixen que poden tenir un paper en el desenvolupament i manteniment del sistema nerviós de vertebrats (Lauren *et al.*, 2003b).

Taula 8. Algunes famílies de gens LRR amb funcions al sistema nerviós de vertebrats.

Gen	Producte (amb domini LRR)	Estructura en dominis	Lligand o receptor (sense LRR)	Ref.
Slit1, 2, 3	Neurogenic extracellular slit proteins 1, 2 and 3	4 X 6 LRR, IgC2, EGF	Roundabout 1, 2, 3	(Nguyen-Ba-Charvet & Chedotal, 2002)
NoR NoRL2 NoRL3	GPI linked Nogo receptor	10 LRR	Nogo, OMgp, MAG p75 NTR (co-receptor)	(Lauren <i>et al.</i> , 2003a; Pignot <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2002)
TrkA TrkB TrkC	Neurotrophin receptor tyrosine kinases 1, 2 and 3	3 LRR, 2 IgC2, TM, TyrK	NGF, (NT3) BDNF, NT4/5, (NT3) NT3 p75-NTR (co-receptor)	(Huang & Reichardt, 2003)
LGI1, 2, 3, 4	Leucine-rich glioma inactivated 1, 2, 3 y 4 (epilepsia)	4 LRR	¿?	(Chernova <i>et al.</i> , 1998)
NLRR1, 2, 3	Neuronal leucine rich repeat protein 1	8 LRR, IgC2, FN3, TM	¿?	(Taguchi <i>et al.</i> , 1996; Taniguchi <i>et al.</i> , 1996)
Pal	Photoreceptor associated LRR superfamily	5 LRR, IgC2, FN3, TM	¿?	(Gomi <i>et al.</i> , 2000)
GAC1	Glioma amplified on chromosome 1	12 LRR, IgC2, TM	¿?	(Almeida <i>et al.</i> , 1998)
ISLR	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich	5 LRR, IgC2	¿?	(Nagasawa <i>et al.</i> , 1999)
LRIG1 (LIG1)	Leucine rich repeat and Ig superfamily	17 LRR, 3 IgC2, TM	¿?	(Suzuki <i>et al.</i> , 1996)
LRR-TM1, 2, 3, 4	Leucine rich repeat transmembrane neuronal	12 LRR, TM	¿?	(Lauren <i>et al.</i> , 2003b)
AMIGO1, 2, 3	Amphoterin induced gene and ORF	8 LRR, IgC2, TM	AMIGO1, 2, 3	(Kuja-Panula <i>et al.</i> , 2003)
SLITRK1, 2,3,4,5,6	Slit and trk like gene	2 X (3-4 LRR), TM	¿?	(Aruga & Mikoshiba, 2003)

Estudis amb la família de proteïnes anomenades AMIGO (amphoterin-induced gene and ORF) han obtingut dades funcionals més concretes. S'han identificat fins avui tres membres, dels quals el membre originari, la proteïna AMIGO, ha estat implicada en el creixement i fasciculació axonal (Kuja-Panula *et al.*, 2003).

Altres proteïnes amb dominis LRR han estat identificades en malalties d'origen neurològic. És el cas del gen LGI1 (leucine-rich glioma inactivated 1) del cromosoma 10 humà, la pèrdua de funció del qual promou la progressió tumoral de les cèl·lules gials i mutacions puntuals han estat associades a l'epilèpsia parcial autosòmica dominant (Gu *et al.*, 2002a; Kalachikov *et al.*, 2002; Morante-Redolat *et al.*, 2002). En el cas del gen NYX (nyctalopin), la seva implicació en els circuits retino-neurals ha estat demostrada mitjançant estudis d'expressió i gràcies a l'identificació de mutacions en casos de ceguesa estacionària nocturna congènita lligada al cromosoma X (XLCSNB) (Bech-Hansen *et al.*, 2000; Pesch *et al.*, 2003; Pusch *et al.*, 2000).

És important destacar la presència d'altres dominis d'interacció entre proteïnes en la majoria de proteïnes LRR citades anteriorment. És el cas per exemple dels dominis immunoglobulina (Ig). Proteïnes contenint dominis Ig han estat implicades en nombrosos i diversos processos del desenvolupament del sistema nerviós com la migració neuronal, guiatge axonal, sinaptogènesi, així com en el manteniment i funcionament de les xarxes neuronals en l'individu adult (Rougon & Hobert, 2003). Els dominis Ig han estat incorporats en un nombre creixent de receptors i proteïnes d'adhesió i proporcionen part de la base estructural per a generar una elevada variabilitat en les interaccions moleculars (Rougon & Hobert, 2003). És també comú identificar la presència de dominis fibronectina tipus III (FNIII) en proteïnes LRR. En aquest cas es tracta també d'un domini d'interacció proteïna-proteïna que actuaria estabilitzant les interaccions conduïdes per dominis de reconeixement més específic (Potts & Campbell, 1994).

PART III: Objectius

- Caracterització a nivell genòmic i transcripcional del gen LRRN6A/LERN1 localitzat a 15q24 en humans
- Realització d'estudis funcionals per tal de començar a elucidar quin és el paper de la proteïna LERN1 en el sistema nerviós central

PART III

Resultats

Resultats

La tercera part d'aquesta tesi té com a objecte a LRRN6A/LERN1, gen identificat en el marc del projecte Eurolmage a la regió 15q24 en el context de l'instabilitat genòmica de la regió 15q24-q26 i la seva potencial participació en la susceptibilitat a manifestar trastorns d'ansietat. LRRN6A/LERN1 pertany a una superfamília de gens que en vertebrats tenen una funció primordial durant el desenvolupament del sistema nerviós i en mecanismes de plasticitat neuronal de l'adult. Aquesta dada juntament amb el seu patró d'expressió altament enriquit a nivell de sistema nerviós fan de la caracterització de LRRN6A, i la proteïna per la qual codifica -LERN1-, un objectiu interessant i atractiu. La primera descripció de LRRN6A i una primera caracterització funcional de la proteïna LERN1 constitueixen les seccions següents d'aquest treball.

1. Identificació i caracterització de LRRN6A/LERN1 i anàlisi del seu patró d'expressió

La publicació següent exposa el procés d'aïllament del gen LRRN6A, l'identificació dels corresponents gens ortòlegs i paràlegs, la similitud a proteïnes amb papers crucials en el desenvolupament i manteniment del sistema nerviós i la seva posició en una regió genòmica altament complexa de potencial susceptibilitat a trastorns mentals. S'analitza en aquest treball de manera exhaustiva el patró d'expressió de LRRN6A durant el desenvolupament i etapa adulta del ratolí. Les figures que apareixen a l'article en blanc i negre s'adjunten en el seu format original, és a dir, en color, a continuació del treball publicat. Les restriccions d'espai inherents a qualsevol publicació científica no van permetre, en el seu moment, incloure figures addicionals en referència a l'expressió de LRRN6A durant els estadis embrionaris. S'inclou en aquesta tesi, per tant, un annex amb figures no publicades que il·lustren l'expressió de LRRN6A durant aquesta etapa.

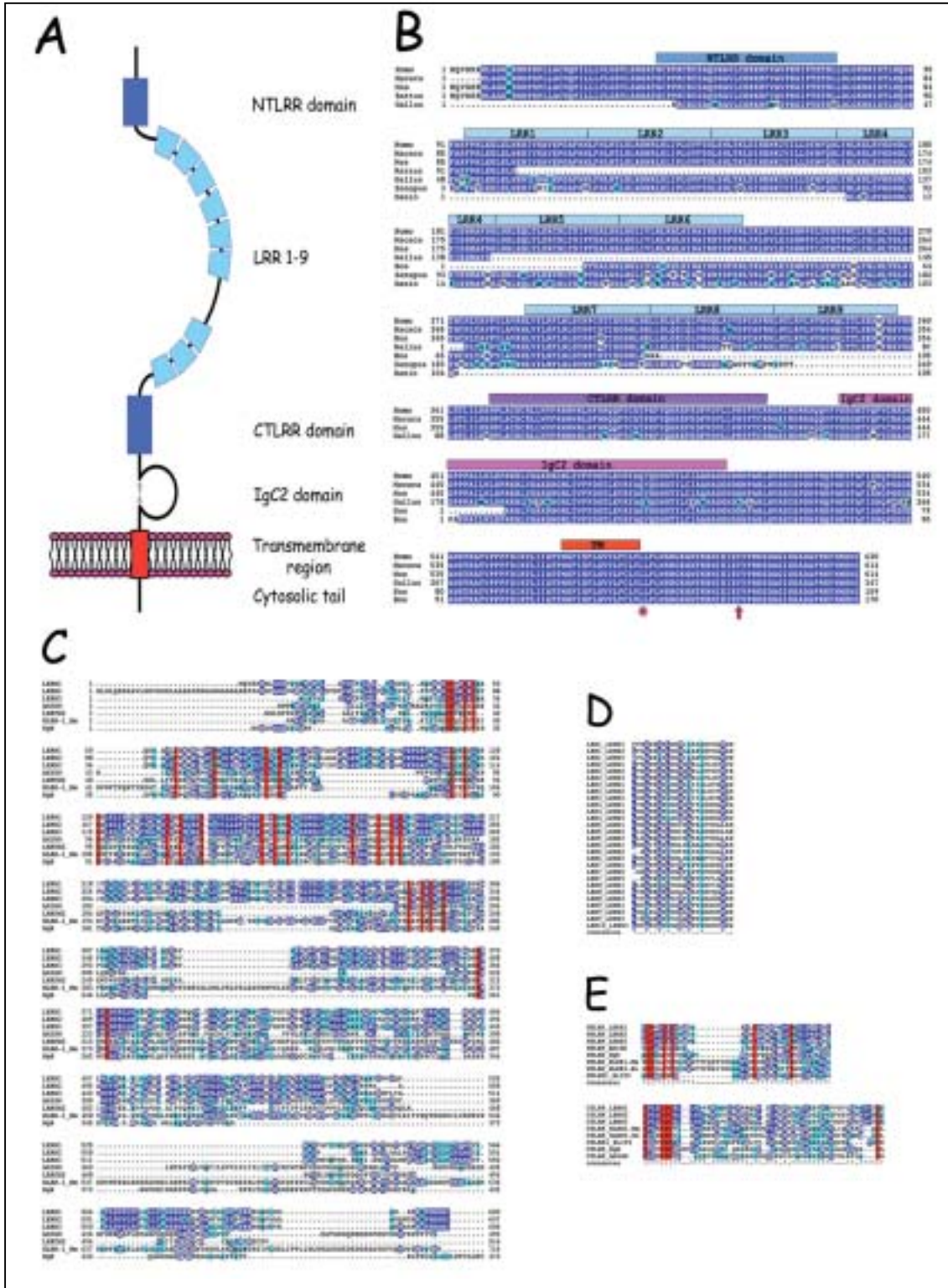


Figura 1 (Carim-Todd *et al.*, 2003)

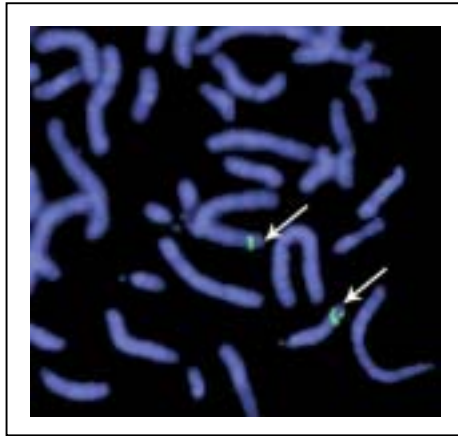


Figura 2 (Carim-Todd *et al.*, 2003)

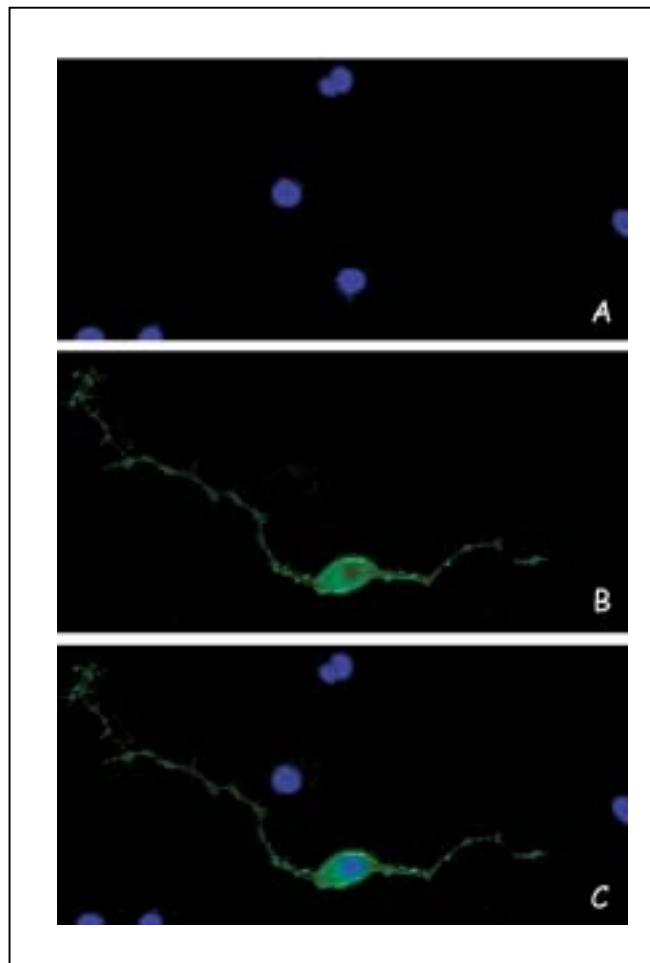


Figura 3 (Carim-Todd *et al.*, 2003)

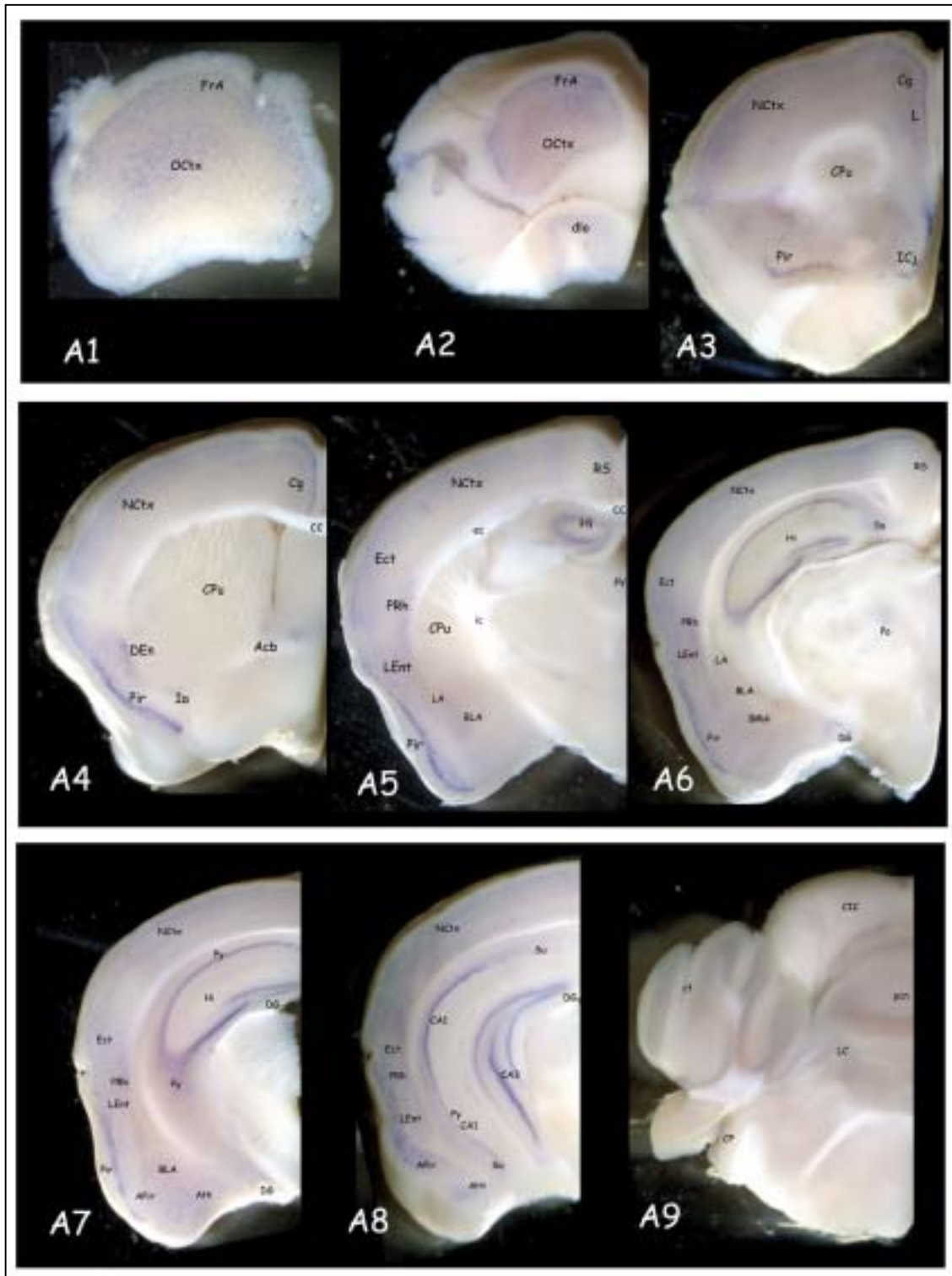


Figura 5A (Carim-Todd *et al.*, 2003)

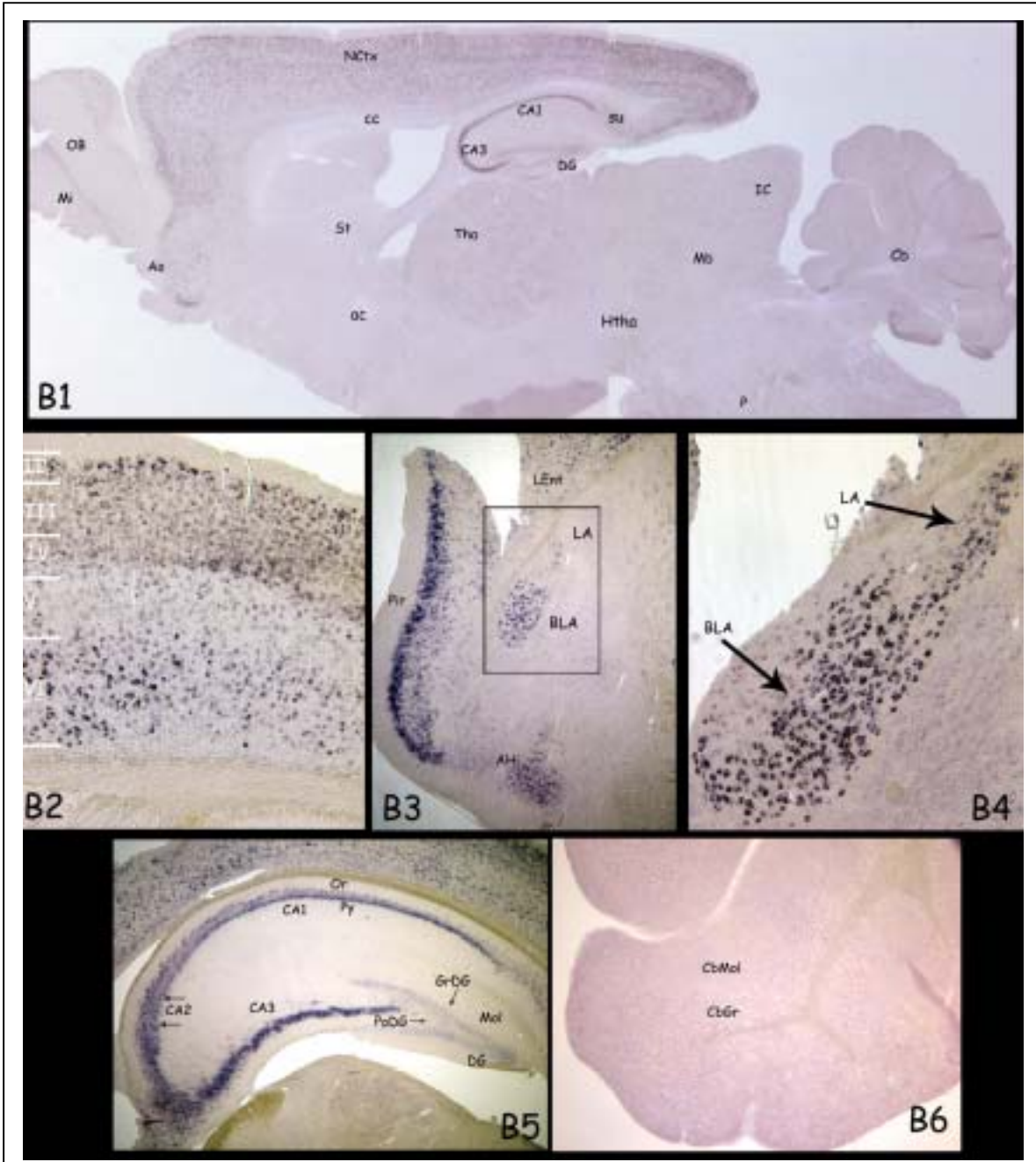


Figura 5B (Carim-Todd *et al.*, 2003)

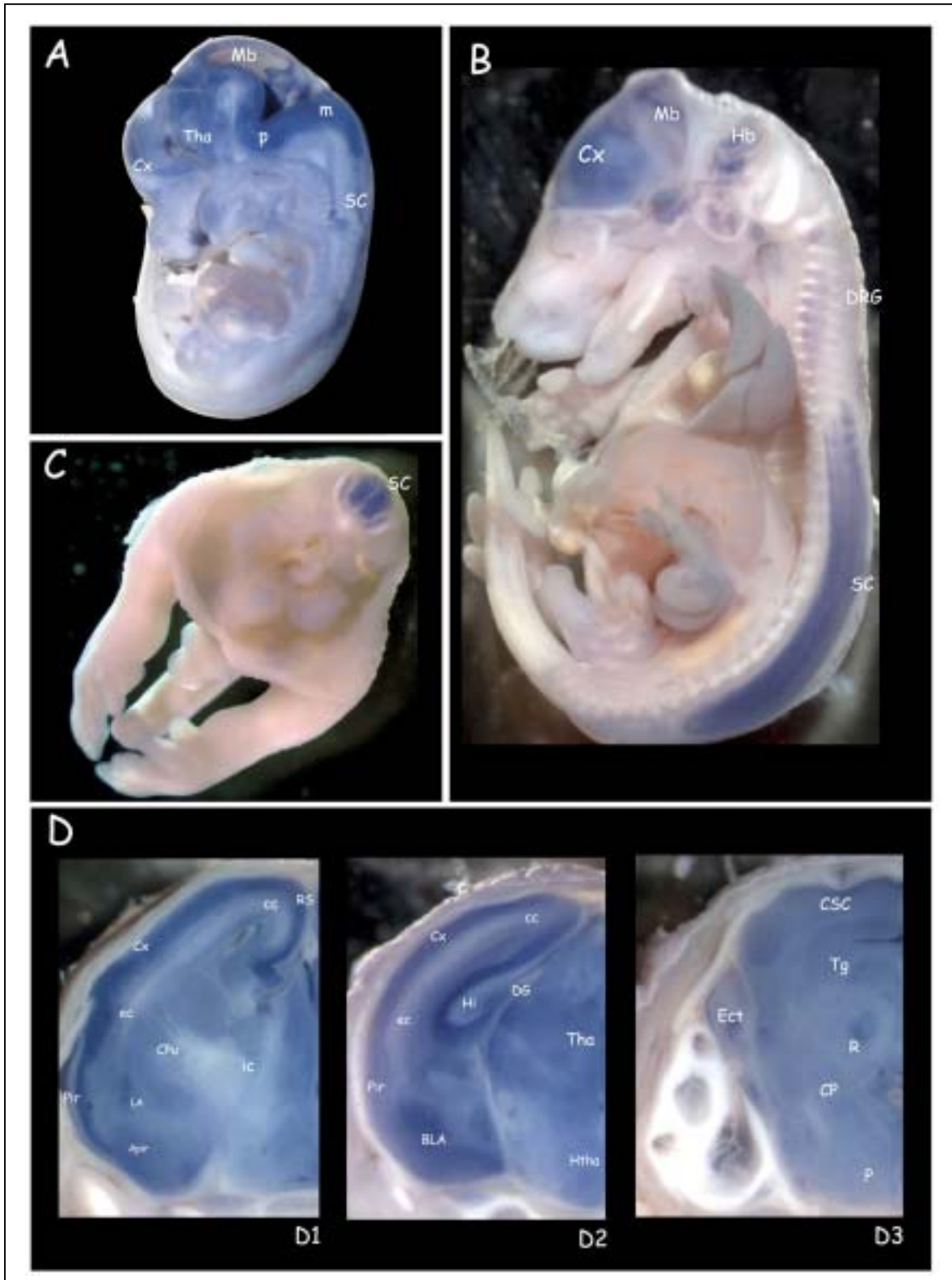


Figura 6 (Carim-Todd *et al.*, 2003)

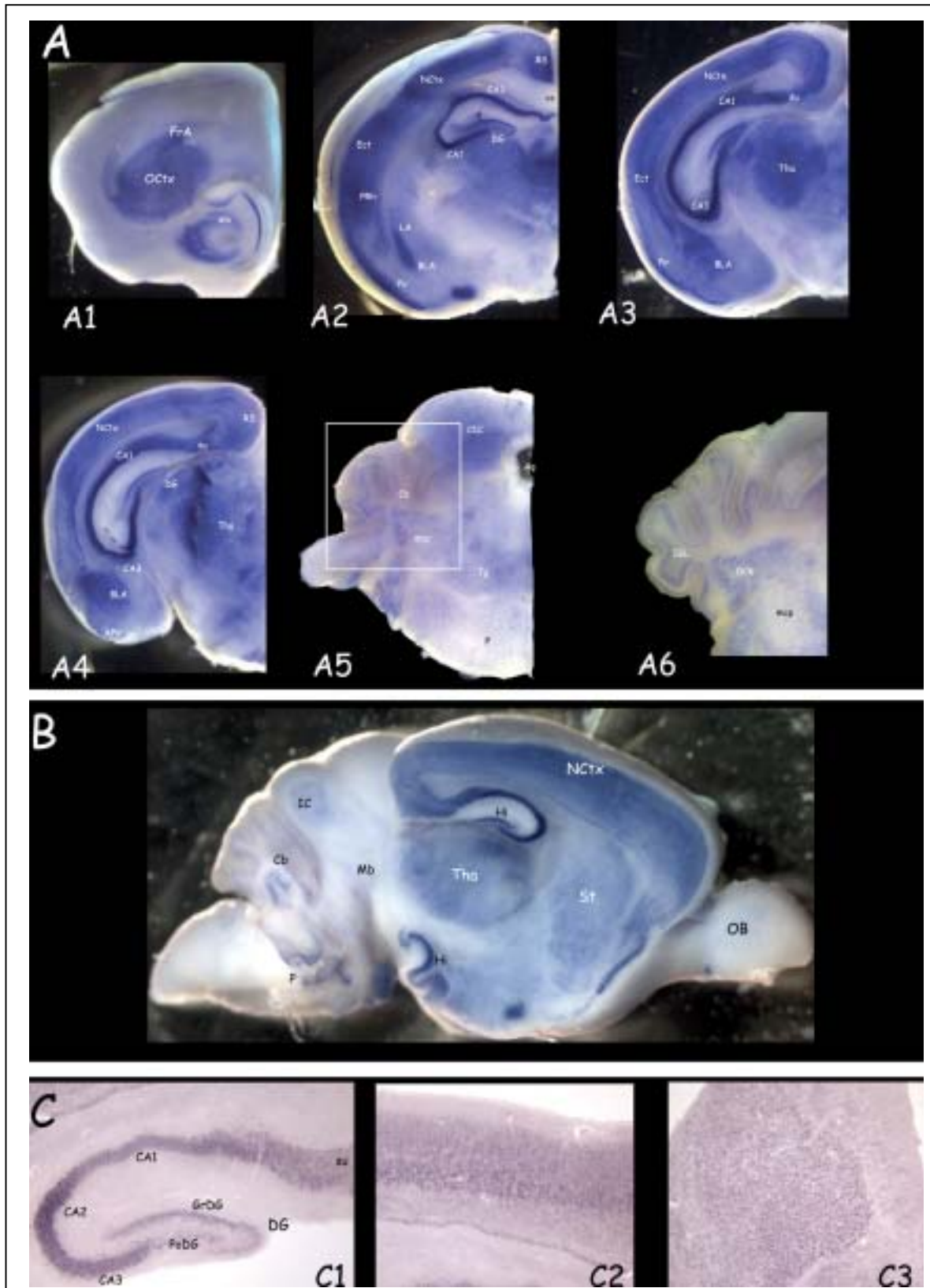


Figura 7 (Carim-Todd *et al.*, 2003)

Annex I: Expressió de LRRN6A/LERN1 durant etapes embrionàries

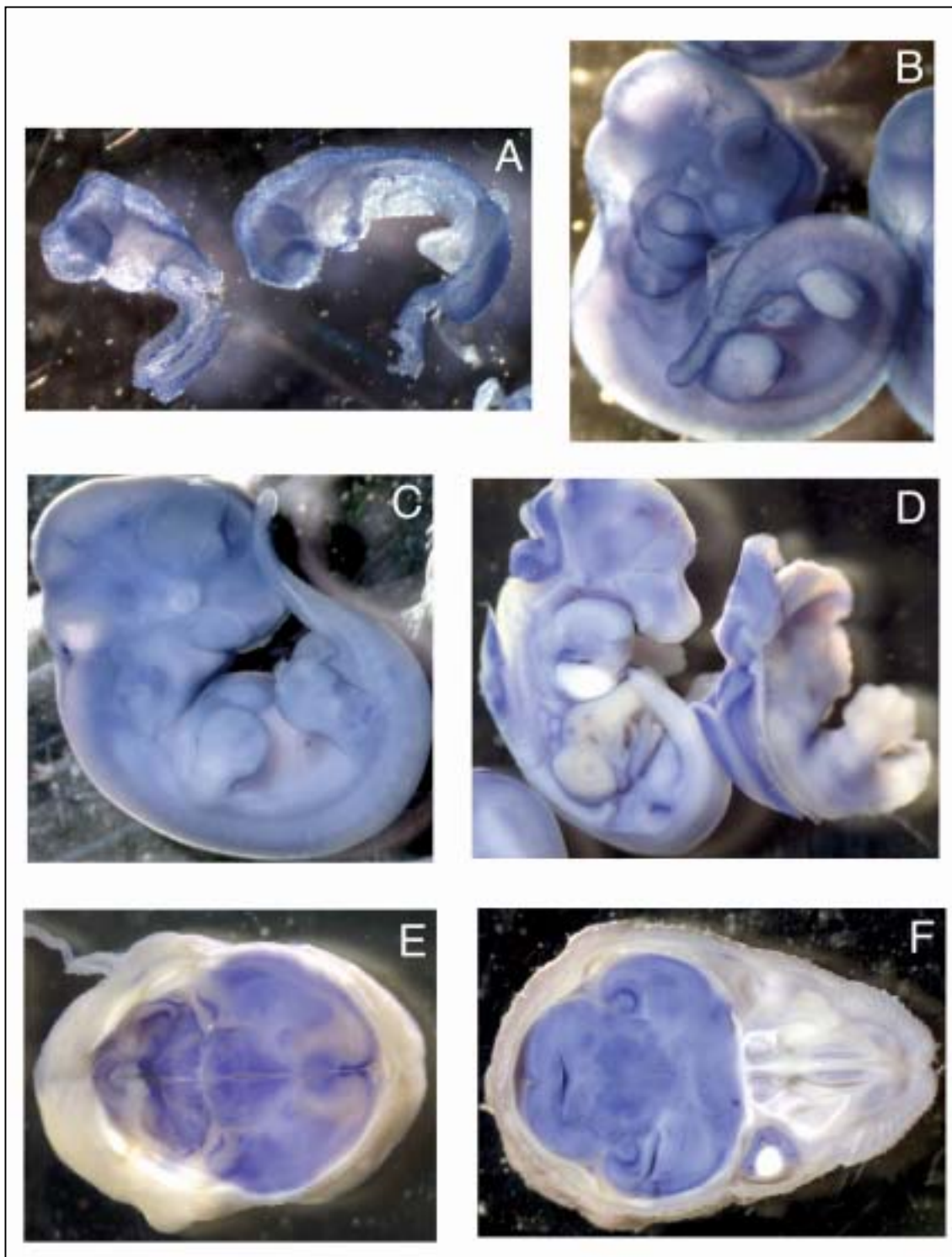


Figura 11. *Patró d'expressió de LRRN6A/LERN1 al llarg del desenvolupament del ratolí mitjançant hibridació in situ. Hibridació in toto sobre embrions d'estadi E8.5 (A); E10.5 (B); E11.5 (C); E13.5 (D); seccions transversals cervell d'estadis E15.5 (E); E17.5 (F).*

II. Estudis funcionals preliminars sobre LERN1: doble híbrid, pull-down i generació d'anticossos

A. LERN1 interacciona in vitro amb el factor de transcripció Myt1-like

Amb l'objectiu d'elucidar el paper de LERN1 a nivell del sistema nerviós, es va crivellar una llibreria de cervell fetal humà usant l'estratègia de doble híbrid en cèl.lules de llevat (Fields & Song, 1989). La finalitat d'aquest estudi era identificar lligands extracel.lulars o proteïnes interaccionants intracel.lulars que permetessin posicionar LERN1 en un procés cel.lular específic aportant dades sobre el seu paper i funció. Es van dur a terme crivellatges independents amb dues construccions diferents de LERN1 en el vector d'expressió pAS2-1 (Clontech) en pauta de lectura oberta amb el domini d'unió a DNA de la proteïna GAL4 (GAL4BD) (Figura 12).

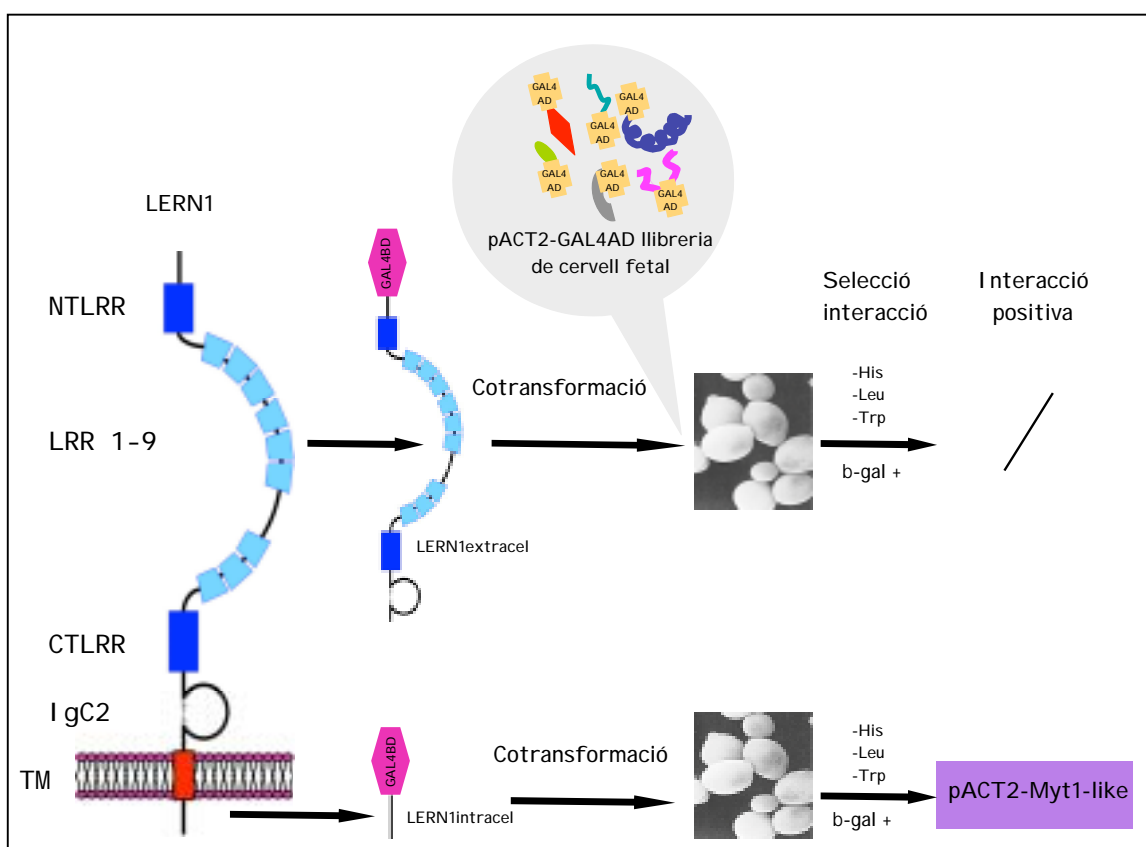


Figura 12. Construccions de LERN1-GAL4BD usades pel crivellatge de la llibreria de cervell fetal mitjançant assaig de doble-híbrid en cèl.lules de llevat. LRR, domini ric en leucina; NTLRR, domini LRR N-terminal; CTLRR domini LRR C-terminal; IgC2, domini immunoglobulina tipus C2; TM, domini transmembrana; GAL4BD, domini d'unió a DNA de la proteïna GAL4, GAL4AD, domini d'activació de la transcripció de GAL4.

En primer lloc es va utilitzar una fusió de la regió extracel.lular completa de LERN1 al domini GAL4BD amb l'idea d'aïllar proteïnes candidates a ser lligands extracel.lulars. L'experiment es va repetir dues vegades amb un crivellatge total estimat de 100000 clons de la llibreria. No es va aconseguir observar cap interacció positiva. Tot i que el número de clons crivellats pot ser augmentat realitzant més assajos per tal d'incrementar la probabilitat de detectar interaccions, és important tenir en compte les dificultats intrínseques existents en la caracterització de les interaccions extracel.lulars mitjançant aquesta estratègia (veure Discussió). El mateix tipus d'experiment es va realitzar amb una construcció que contenia la regió intracel.lular de LERN1 fusionada amb el domini d'unió a DNA de GAL4. En aquest cas es van crivellar 62000 clons, dels quals 81 van créixer en medi sel.lectiu per a l'interacció. Aquests 81 clons cotransformats van ser analitzats mitjançant assaig d'expressió de b-galactosidasa per tal d'identificar les interaccions reals i descartar els falsos positius. Els clons que van mostrar interacció real van ser seqüenciats. Es van identificar dos clons corresponents a la proteïna d'unió a microtúbuls RANBPM (Ran Binding Protein Microtubules) (Nakamura *et al.*, 1998). Els experiments control de cotransformació a llevat d'aquest gen i LERN1 van demostrar que aquesta observació corresponia a un resultat artefactual, un fals positiu. El clon restant que va mostrar interacció positiva va correspondre a l'extrem C-terminal del factor de transcripció Myt1-like (Myelin Transcription factor 1 like) (Kim *et al.*, 1997). Els experiments control de cotransformació van confirmar la positivitat d'aquesta interacció en cèl.lules de llevat.

L'interacció entre la regió intracel.lular de LERN1 i l'extrem C-terminal de Myt1-like observada en llevat va ser confirmada *in vitro* mitjançant experiments de *pull-down* en bacteri *E.coli* amb extractes totals de cèl.lules HEK293. Es va utilitzar una fusió de LERN1 intracel.lular amb la proteïna glutatió-S-transferasa (GST) en un vector de sobreexpressió induïble mitjançant IPTG. La proteïna de fusió acoblada a boles de glutatió-sefarosa es va incubar amb extractes totals de cèl.lules HEK293 que expressen proteïna Myt1-like endògena. Per a l'identificació de Myt1-like en transferència de Western es va usar un anticòs policlonal de conill cedit per la Dra. Hudson (NIH, Estats Units)(Kim *et al.*,

1997). Es va observar precipitació de Myt1-like en incubar els extractes de HEK293 amb LERN1-GST i no va observar-se senyal quan es realitzava l'experiment control usant només GST per a l'incubació (Figura 13).

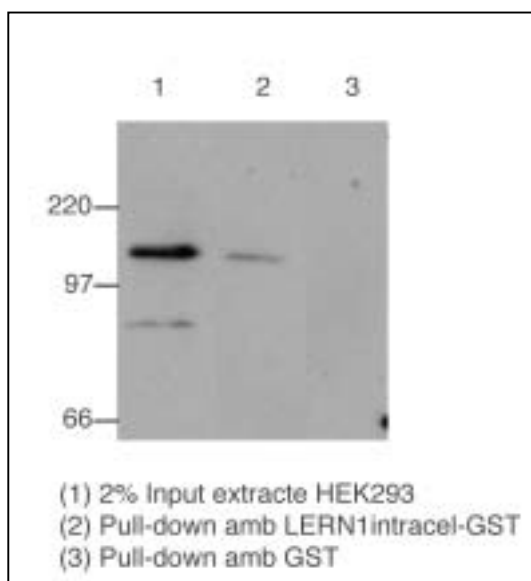


Figura 13. Transferència de Western utilitzant l'anticòs antiMyt1-like per a detectar Myt1-like precipitada amb LERN1intracel-GST.

S'observa precipitació en el cas de LERN1intracel-GST i no s'observa senyal per a GST sola.

El factor de transcripció Myt1-like també es troba a la bibliografia com a Png-1 (post mitòtic neural gene 1) o NZF-1 (neural zinc factor 1). És un membre d'una subclasse especial de factors de transcripció amb dominis dit de zinc (Jiang *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Weiner & Chun, 1997). La proteïna MYT1-like està caracteritzada per la presència de sis dominis zinc-finger d'unió a DNA, una regió d'alt contingut en residus àcids i una regió rica en residus serina i treonina, els quals són comuns en els dominis d'activació de la transcripció de nombrosos factors nuclears.

B. Patró d'expressió de Myt1-like

Mitjançant l'anàlisi en Western d'extractes totals de teixit de ratolí es va comprovar que els patrons d'expressió de Myt1-like i de LERN1 es trobaven en concordança amb els resultats d'interacció *in vitro* obtinguts anteriorment. D'aquesta manera es va demostrar expressió de Myt1-like en teixit cerebral adult usant l'anticòs policlonal obtingut de la Dra. Hudson. La distribució a nivell tissular de la proteïna Myt1-like endògena és abundant al sistema nerviós central. Aquest fet permet pensar que l'interacció amb LERN1 observada *in vitro* pugui tenir també lloc entre les proteïnes natives (Figura 14).

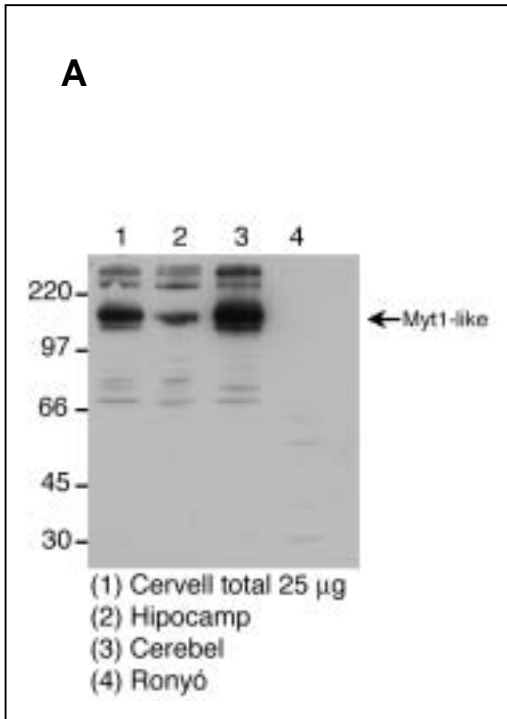
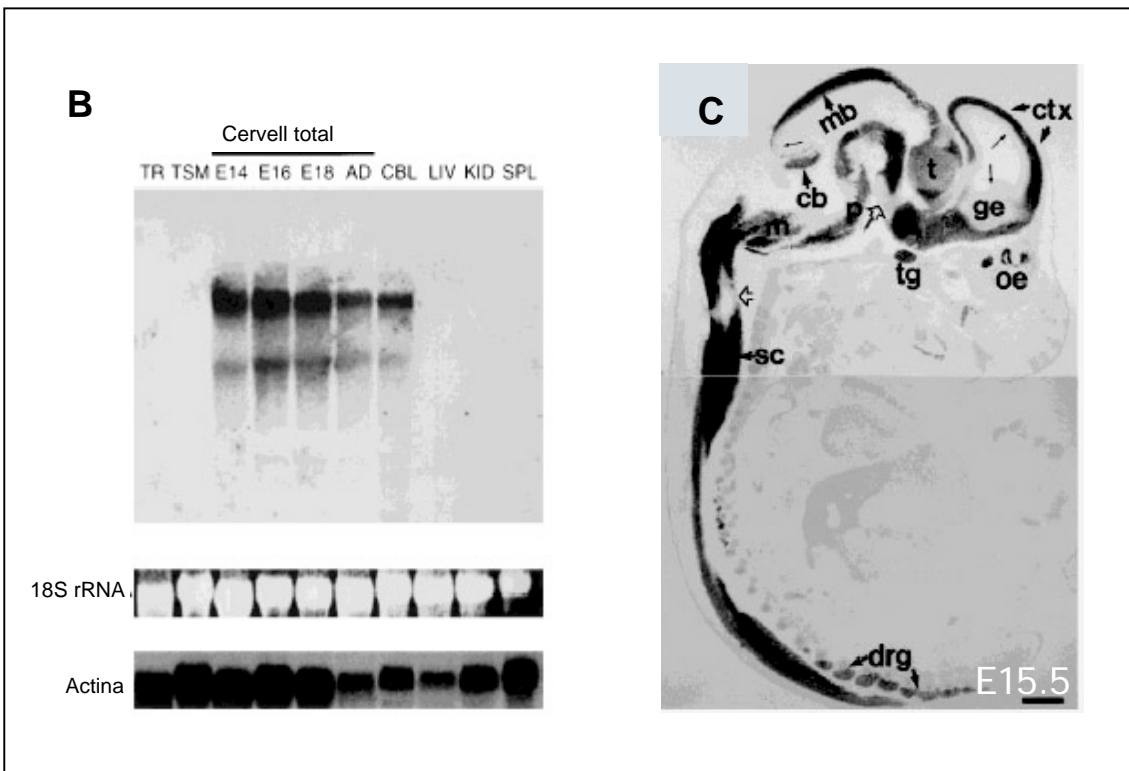


Figura 14. (A) Determinació del patró d'expressió de la proteïna Myt1-like (130 kDa) en extractes de teixit de ratolí. Es va detectar proteïna Myt1-like al sistema nerviós central i absència en teixits d'origen no neural com el ronyó. (B) Patró d'expressió de Myt1-like a nivell transcripcional mitjançant transferència de Northern. (C) Expressió de Myt1-like per hibridació in situ en estadi E15.5 del desenvolupament. TR i TSM, línies cel.lular de neuroblasts; AD, adult; CBL, cerebel; LIV, fetge; KID, ronyó; SPL, melsa; ctx, escorça; t, tàlem; mb, diencèfal; cb, primordi cerebelar; p, pons; m, tronc de l'encèfal; sc, medul.la espinal. Figures B i C adaptades de (Weiner & Chun, 1997).



C. Producció d'anticossos antiLERN1

Per tal d'aprofundir en l'estudi de la proteïna LERN1 endògena, la seva funció i les interaccions amb altres proteïnes va ser imprescindible generar anticossos específics. La generació d'anticossos es va realitzar en conill i en gallina. Es van obtenir anticossos policlonals dels següents animals: dos conills inoculats amb la proteïna de fusió LERN1ep-GST (LERN1 extracel.lular parcial fusionat a GST), dos conills inoculats amb un pèptid corresponent a la regió extracel.lular proximal de LERN1 i finalment dues gallines ponedores amb la mateixa fusió LERN1ep-GST usada pel primer parell de conills (Figura 15). Es va seguir un protocol estàndard d'immunització per a conills i gallines inoculant 0.8-1mg/animal de proteïna total purificada a partir de gel de poliacrilamida (veure Annex Material i Mètodes).

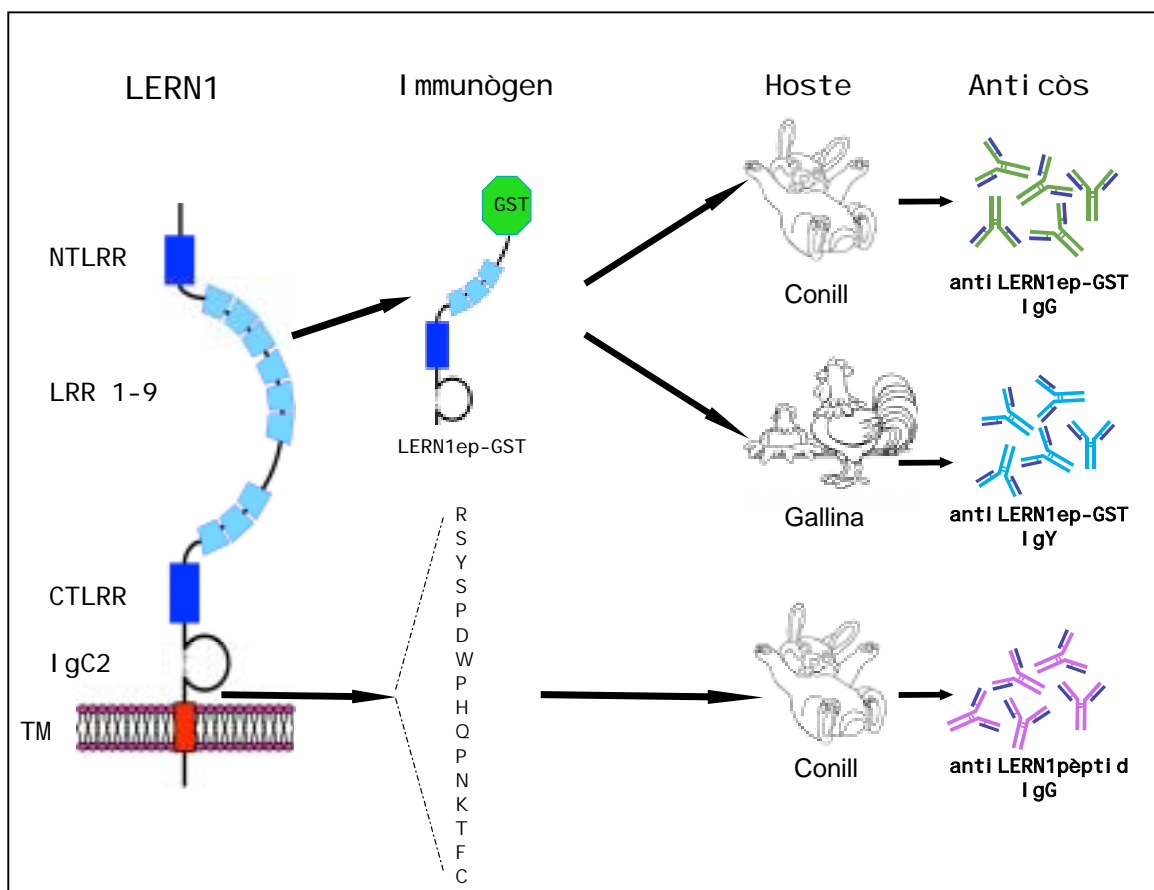


Figura 15. Generació d'anticossos policlonals antiLERN1. Es mostren les molècules usades per immunitzar i els animals corresponents en cada cas.

D. Caracterització dels anticossos antiLERN1

1-Immunodetecció de la proteïna de fusió utilitzada com a immunògen

Es va testar la capacitat dels anticossos antiLERN1ep-GST de conill per identificar la proteïna de fusió usada per a l'immunització dels animals hostes. Mitjançant transferència de Western es va comprovar que els anticossos policlonals presentaven senyal clar tant per la proteïna immunògena purificada com per la proteïna sobreexpressada present en extractes totals d'*E.coli* induïts. L'especificitat en la detecció de LERN1ep-GST es va confirmar usant la corresponent mostra de sèrum no immunitzat (preimmune) i comprovant l'absència de senyal que pogués correspondre a LERN1ep-GST (Figura 16).

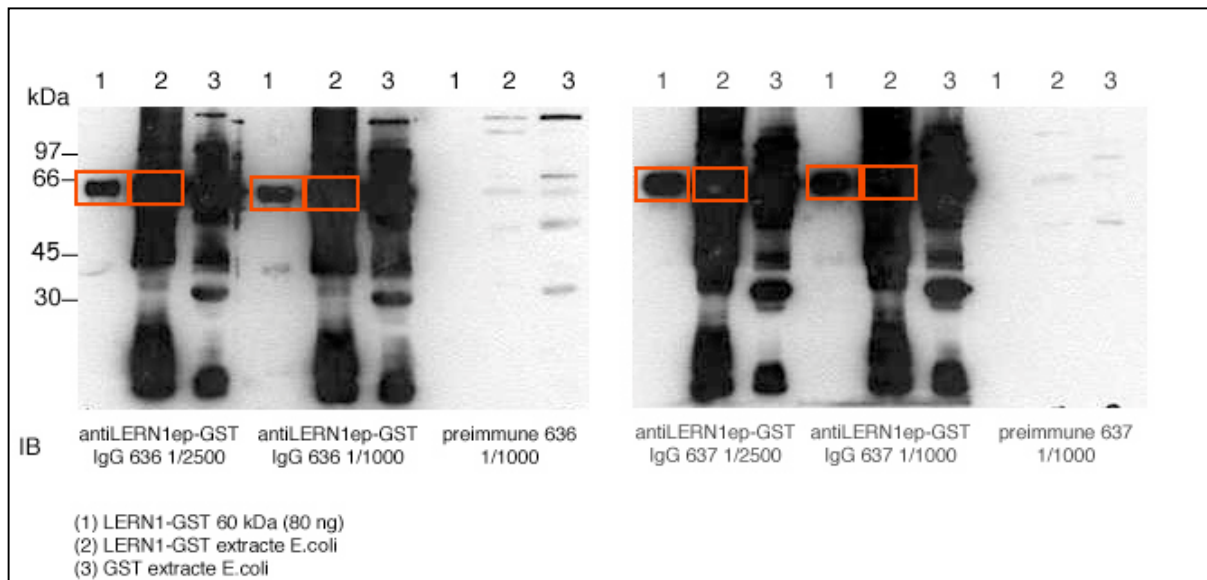


Figura 16. *Detecció de la proteïna usada com a immunògen, LERN1ep-GST 60kDa (enquadrada), amb dilucions diferents de sèrum post-immunització i sèrum pre-immune dels dos animals inocul.lats.*

2-Immunodetecció de proteïna de fusió expressada en cèl.lules eucariotes

Per tal d'estudiar el comportament dels anticossos enfront cèl.lules eucariotes es van transfectar cèl.lules COS i HEK293 amb una construcció contenint el transcrit sencer de LERN1 fusionat a l'epítot FLAG (vector pCMVtag4a, Stratagene) i es van testar els anticossos per la detecció de LERN1-Flag mitjançant transferència de Western i protocols d'immunocitoquímica. Per a la detecció per transferència es van recollir extractes totals de cèl.lules transfectades, es van resoldre en gel de poliacrilamida i es van transferir a nitrocel.lulosa. Es van realitzar incubacions amb els anticossos generats i les

mostres preimmunes corresponents. Tots els anticossos vans ser capaços de reconèixer específicament LERN1-Flag després d'una incubació de 13-14h a 4°C (Figura 17).

Es va comprovar l'especificitat de la detecció de l'anticòs antiLERN1ep-GST

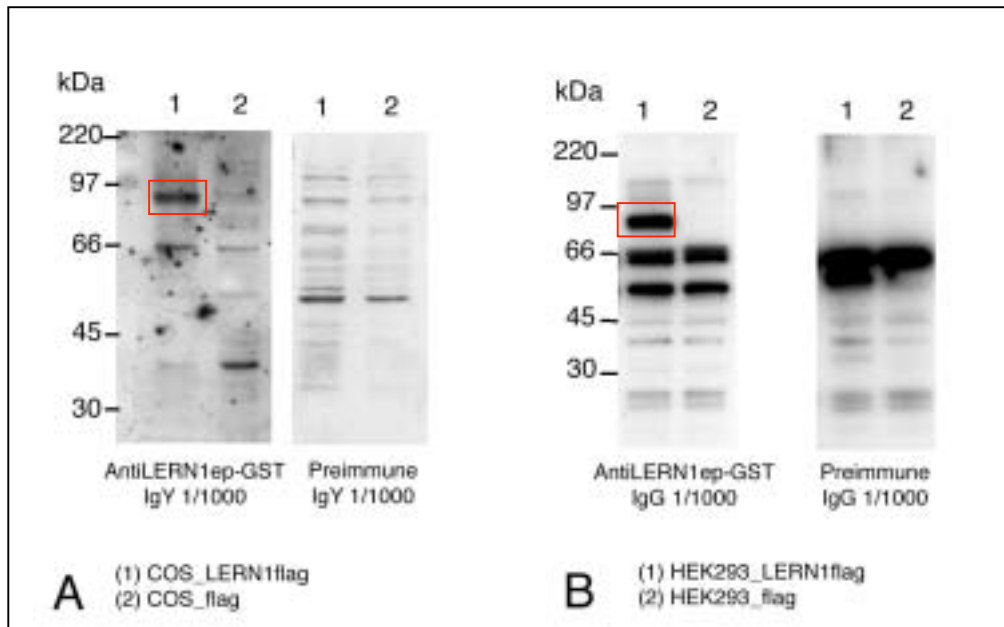


Figura 17. Detecció de proteïna LERN1flag transfectada en cèl.lules eucariotes amb els anticossos obtinguts en gallina (IgY) (A) i en conill (IgG) (B).

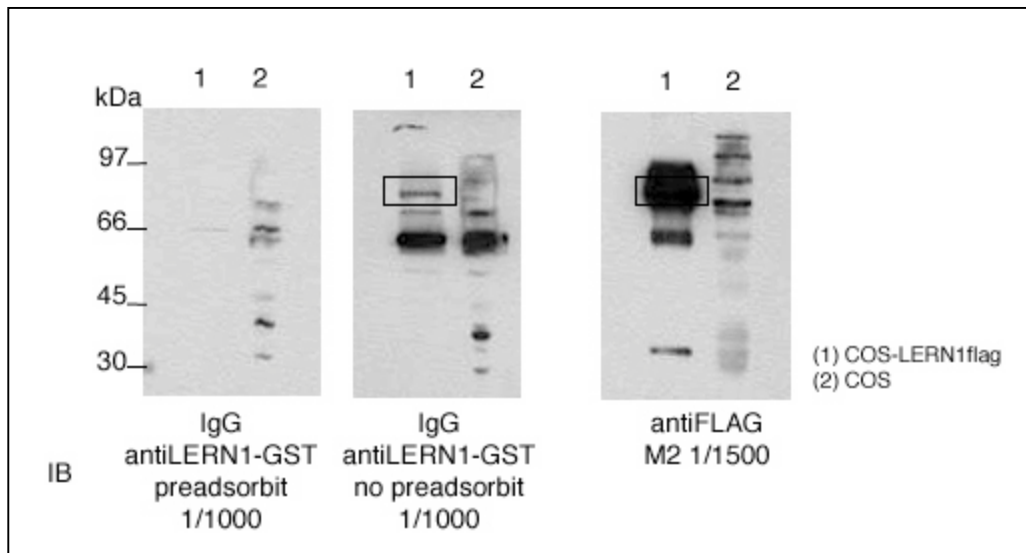


Figura 18. Pèrdua del senyal corresponent a LERN1flag quan s'utilitza l'anticòs prèviament preadsorbit amb la proteïna immunògena. S'inclou la detecció amb l'anticòs monoclonal antiFLAG com a control positiu.

de conill comparant la diferència en la capacitat de detecció entre l'anticòs prèviament preadsorbit amb la proteïna immunògena i l'anticòs natiu (Figura 18). Es va demostrar que la preadsorció amb la proteïna diana era capaç de reduir significativament la capacitat de l'anticòs per detectar LERN1-Flag en extractes cel.lulars. Cal destacar la presència de més senyal apart de l'esperat per a LERN1-Flag (veure Discussió).

Per a la detecció mitjançant immunocitoquímica es van transfectar cèl.lules COS i HEK293 amb la mateixa construcció mencionada anteriorment, LERN1-Flag. Es van processar en paral.lel utilitzant els anticossos antiLERN1ep-GST de conill (IgG) i l'anticòs antiFlag M2 (SIGMA) com a control positiu. Aquests experiments van confirmar els resultats obtinguts per transferència de Western. Es va obtenir una distribució de LERN1-Flag amb els anticossos policlonals equivalent al patró obtingut amb anti-Flag (Figura 19). En aquest cas, la detecció d'expressió de LERN1-Flag amb els anticossos policlonals és evident i es troba en concordància amb el patró cel.lular de LERN1-Flag que es detecta amb l'anticòs monoclonal contra l'epítop Flag. Els anticossos antiLERN1 policlonals són capaços, per tant, d'identificar la proteïna LERN1-Flag

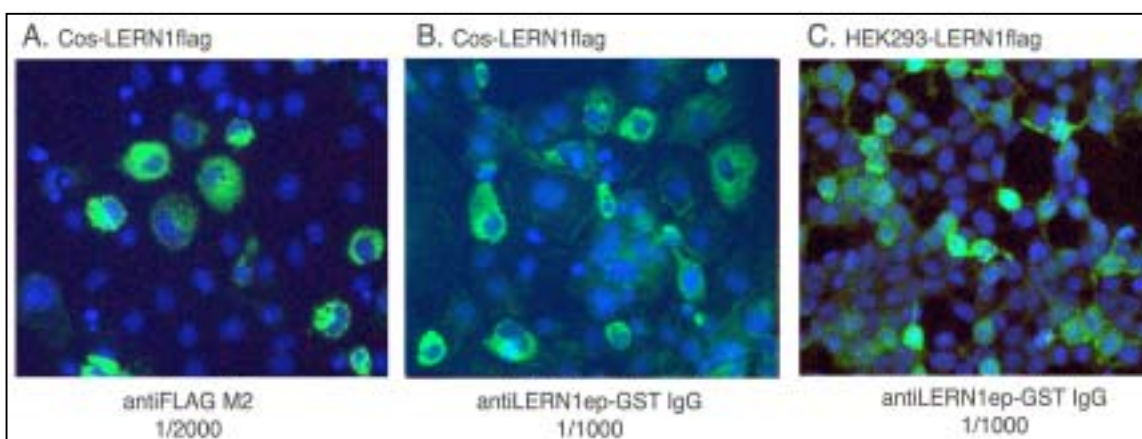


Figura 19. *Detecció mitjançant immunocitoquímica de LERN1flag transfectada en cèl.lules eucariotes COS i HEK293. Els nuclis cel.lulars es troben tenyits de blau amb DAPI.*

transfectada en cèl.lules en cultiu.

3-Anticòs antiLERN1ep-GST de conill en experiments d'immunoprecipitació

Es va assajar la capacitat de l'anticòs de conill antiLERN1ep-GST per immunoprecipitar proteïna de fusió LERN1-Flag sobreexpressada en cèl.lules

COS. Per dur a terme aquest experiment es van usar extractes de cèl.lules COS transfectades d'igual mode que en l'apartat anterior. Es van incubar amb l'anticòs antiLERN1ep-GST unit a boles de sefarosa-proteïna A (Amersham-Pharmacia). Després dels rentats corresponents per eliminar unions inespecífiques es van precipitar els complexos anticòs-proteïnaA-sefarosa i es van sotmetre a electroforesi en gel de poliacrilamida. L'immunodetecció usant l'anticòs antiFLAG M2 (SIGMA) va detectar la banda corresponent a la proteïna de fusió LERN1-Flag precipitada. Aquesta banda era absent en el cas de l'experiment equivalent usant el sèrum preimmune per immunoprecipitar (control negatiu) (Figura 20).

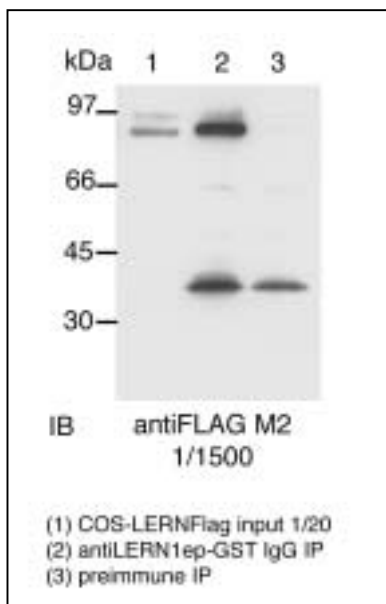


Figura 20. Assajos d'immunoprecipitació amb antiLERN1ep-GST IgG a partir d'extractes de cèl.lules transfectades amb LERN1flag.

(control negatiu) (Figura 20).

4-Detecció de LERN1 endògena en mostres de teixit

Per tal de caracteritzar l'especificitat i sensibilitat dels anticossos en detectar l'expressió de proteïna endògena es va procedir a obtenir teixit cerebral corresponent a diferents estadis del desenvolupament del ratolí. Es va obtenir teixit cerebral corresponent als estadis següents: fetus de 12.5 dies i estadis postnals de 0 dies (P0), 2 dies (P2), 6 dies (P6), 10 dies (P10), 14 dies (P14), 21 dies (P21) i adult. Per a cada estadi possible es van obtenir per separat extractes totals de cervell i cerebel. Així mateix, per a cada estadi es van extraure cervells sencers per ser processats per immunohistoquímica. Els cervells i cerebels extrets van ser homogeneitzats en tampó de lisi contenen agents antiproteàsics i seguidament congelats en neu carbònica fins a la seva utilització. Abans de la seva resolució en gel de poliacrilamida els extractes van ser sotmesos a sonicació suau i posterior centrifugació per descartar el material insoluble. En aquest cas cap dels tres anticossos emprats va ser capaç de reconèixer amb especificitat significativa una banda de pes molecular (70 kDa) com l'esperada per LERN1 endògena (Figura 21). Les bandes obtingudes amb l'anticòs contra LERN1 i les obtingudes amb el corresponent preimmune no

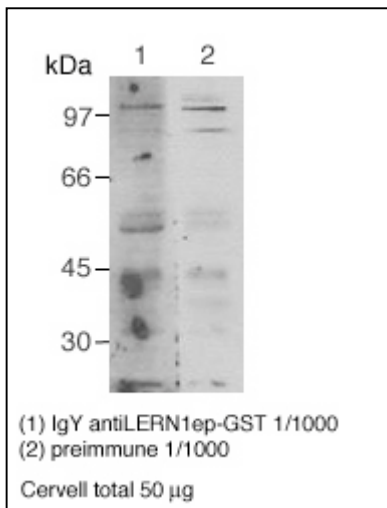


Figura 21. Comportament d'antiLERN1ep-GST IgY en transferència de Western d'extractes cerebrals totals de ratolí adult.

permeten identificar un senyal específic per a LERN1. De la mateixa manera cal destacar la presència de nombroses bandes tant en el cas de l'anticòs com en el cas del preimmune, les quals interfereixen en la detecció d'un senyal específic que correspongui a LERN1 (veure Discussió). Els estudis del patró d'expressió a nivell transcripcional havien indicat que LRRN6A/LERN1 presenta una distribució heterogènia en el cervell adult i una regulació durant el desenvolupament (Carim-Todd *et al.*, 2003). Amb l'objectiu d'identificar una banda de proteïna específica amb expressió diferencial que pogués correspondre a LERN1 endògena

es van analitzar per transferència de Western àrees cerebrals i estadis del desenvolupament diferents amb els anticossos policlonals generats. En aquest cas tampoc va ser possible reconèixer una banda específica d'intensitat variable en funció de l'origen de la mostra (Figura 22).

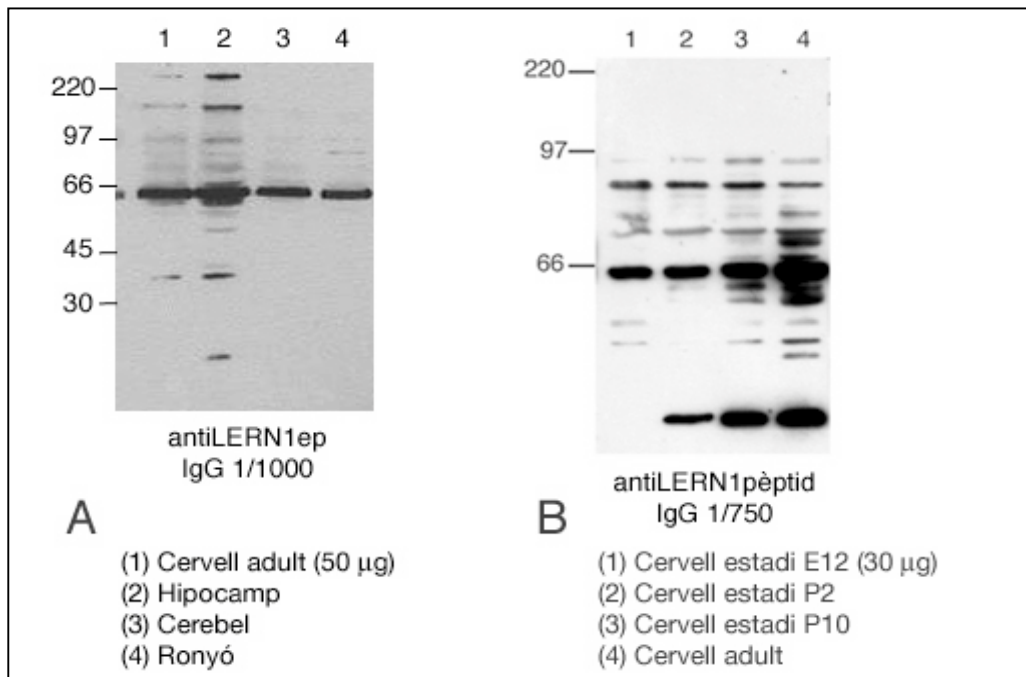


Figura 22. Comportament dels anticossos de conill enfront extractes de cervell. (A) AntiLERN1ep-GST sobre mostres de cervell adult corresponents a regions diferents. (B) AntiLERN1pèptid enfront extractes de diferents estadis del desenvolupament.

Aquest fet, però, pot explicar-se per altres raons apart d'una baixa especificitat dels anticossos testats (veure Discussió). No és per tant, una indicació inequívoca de la qualitat dels anticossos i de la seva utilitat per a detectar LERN1. Però és un indicatiu de l'importància de la caracterització preliminar de l'anticòs, de la seva capacitat de detecció i del patró de bandes que produeix.

Per als experiments d'immunohistoquímica els cervells aïllats van ser immediatament congelats en neu carbònica i mantinguts a -80°C fins a la seva utilització. Per la caracterització dels anticossos contra LERN1 en immunohistoquímica es van obtenir seccions coronals i es van emprar diversos protocols pel seu tractament amb l'objectiu d'optimitzar al màxim el senyal obtingut i reduir la presència d'inespecificitats (veure Annex II). Es van analitzar els resultats mitjançant microscopia de fluorescència i no va ser possible obtenir un senyal únic específic per a LERN1 (Figura 23). El corresponent control negatiu (mostra preimmune) detectava senyal significatiu i suggeria

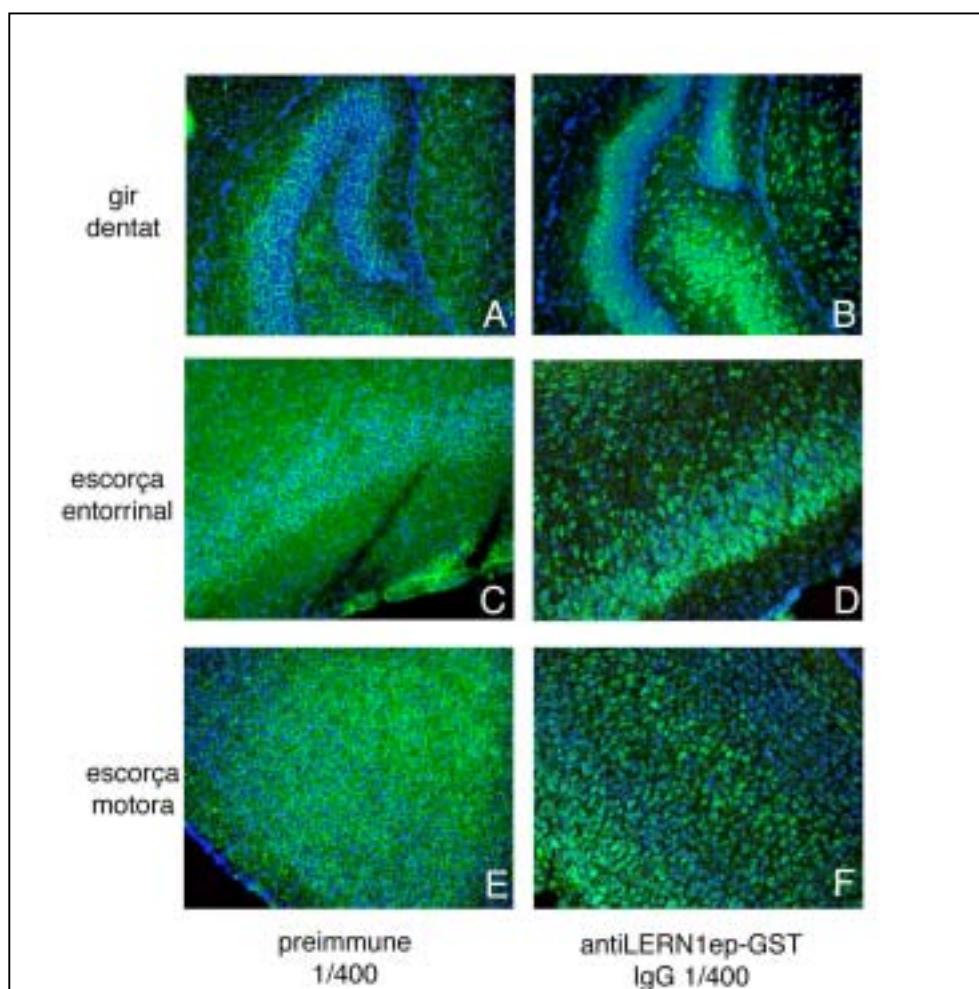


Figura 23. *Patró d'expressió sobre seccions coronals de cervell murí d'estadi P10. (A), (C) i (E) sèrum preimmune de conill; (B), (D) i (F) antiLERN1ep-GST IgG. En blau, nuclis cel.lulars amb DAPI.*

l'existència de reactivitat inicial de la mostra no immunitzada amb molècules del teixit cerebral de ratolí i que podia emascarar el senyal real dels anticossos antiLERN1 (veure Discussió).

E. Purificació per afinitat dels anticossos antiLERN1 i caracterització preliminar

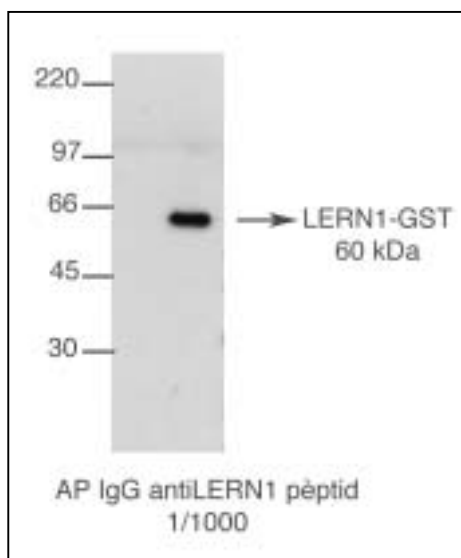


Figura 24. *Detecció de LERN1ep-GST amb l'anticòs purificat en columna d'afinitat antiLERN1pèptid IgG.*

Els resultats anteriors van suggerir la necessitat d'incloure un pas de purificació dels anticossos per tal d'enriquir la població d'anticòs antiLERN1 en aquestes mostres i augmentar la seva especificitat i sensibilitat a l'hora de detectar LERN1 endògena en cultiu cel.lular i en teixit. Les purificacions d'anticossos per afinitat impliquen sotmetre l'anticòs policlonal a una columna d'afinitat que conté la proteïna pura o el pèptid diana usat per a immunitzar. Els anticossos específics queden retinguts a la columna i són posteriorment eluïts per separat de la resta de mostra que no interacciona i que pot

ser la causant de les inespecificitats detectades amb l'anticòs no purificat. La purificació per afinitat es va dur a terme amb els anticossos antiLERN1 obtinguts en conill. En el cas del sèrum antipèptid LERN1 la purificació va

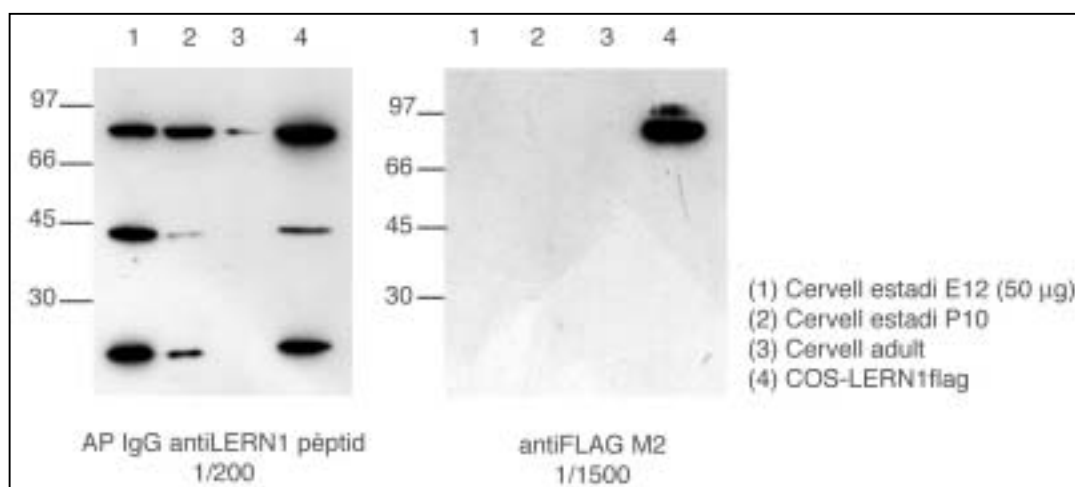


Figura 25. *Patró de bandes obtingut amb l'anticòs purificat antiLERN1pèptid IgG sobre extractes de cervell a diferents estadis del desenvolupament i en cèl.lules COS transfectades amb LERN1flag. S'inclou la detecció amb antiFLAG com a control positiu de transfecció i pes molecular.*

donar lloc a una solució d'anticòs de major especificitat. La presència de bandes extra en les transferències de Western amb extractes cel·lulars i teixit va disminuir significativament en comparació amb l'anticòs no purificat (Figura 24 i 25). Aquests resultats impulsen a recharacterizar l'anticòs purificat per a poder usar-lo en experiments posteriors amb més probabilitat d'èxit en la detecció, si hi és, de la proteïna LERN1 endògena.

