



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 Llena
Departament de Ciències Fisiològiques II,
Unitat de Fisiologia
Universitat de Barcelona 2015

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

DISCUSSIÓ

Durant la realització d'aquesta Tesi s'han obtingut resultats importants que han permès avançar i ampliar els coneixements sobre el paper de GlialCAM en la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC) i aprofundir en el paper del canal CIC-2 en la fisiologia astrocitària així com en les patologies que afecten a la mielina.

Efecte de les mutacions en *GLIALCAM* en el desenvolupament de la MLC.

Diverses formes de leucodistrofies es troben associades a la vacuolització de les beines de mielina que envolten els axons de les neurones centrals. Una subentitat particular d'aquests trastorns degeneratius és la MLC, amb una incidència en la població baixa, la qual cosa dificulta el seu estudi. Des del punt de vista genètic és una malaltia amb heterogeneïtat de *locus*. Així, mutacions tant en *MLC1* com en *GLIALCAM* provoquen el desenvolupament d'aquesta (Leegwater et al., 2001; López-Hernández et al., 2011a).

Per una banda, les mutacions en *MLC1* presenten una disminució en els nivells proteics i la seva retenció al reticle endoplasmàtic (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004), probablement deguda a un defecte de plegament de la proteïna. Desafortunadament, encara es desconeix la funció de la proteïna *MLC1*.

Per l'altra banda, les mutacions en *GLIALCAM* provoquen dos fenotips diferents en els pacients afectats per la MLC. El fenotip *MLC2A*, causat per mutacions recessives, és indistingible del fenotip causat per mutacions en *MLC1* i el fenotip *MLC2B*, causat per mutacions dominants, el qual mostra una millora progressiva de les característiques clíniques de la malaltia (van der Knaap et al., 2012). S'ha descrit gens com *LMNA* (MIM#150330) i *SOX18* (MIM#601618) en els quals tant mutacions dominants com recessives s'associen al desenvolupament de malalties (Irrthum et al., 2003; Raffaele Di Barletta et al., 2000), tot i així, cap dels pacients amb mutacions dominants en aquests gens presentaven una millora del fenotip, com succeeix en els pacients de MLC. Una explicació per a l'existència d'aquests dos fenotips causats per mutacions en *GLIALCAM* es degui a que GlialCAM desenvolupi un paper addicional en els estadis primerencs del desenvolupament (Favre-Kontula et al., 2008) o és possible que el defecte de localització de GlialCAM causat per les mutacions dominants *in vivo* no sigui tant sever com el causat per les mutacions recessives. A més, s'ha descrit que a diferència que en els ratolins, on el procés de mielinització exhibeix el seu pic màxim als tres mesos (ratolí adult) i després es manté a un nivell estable, en els humans el pic màxim de mielinització té lloc durant el primer any de vida i posteriorment cau fins a nivells mínims durant els següents anys. Aquest procés de mielinització juntament amb

el fet que l'expressió de MLC1 en el cervell és major durant el procés de mielinització i que posteriorment s'estabilitza (Dubey et al., 2014) suggereix que el paper que juga MLC1, així com GlialCAM, sigui essencial principalment en estadis primerencs del desenvolupament de la malaltia en humans. És en aquests estadis quan el procés de mielinització està més actiu i aquest fet podria explicar la reversibilitat del fenotip a mesura que s'avança en els estadis de desenvolupament.

Bioquímicament, GlialCAM actua com a subunitat β de MLC1, interaccionant directament i dirigint la localització de MLC1 a les unions cel·lulars (López-Hernández et al., 2011b). Alhora, també actua com a subunitat auxiliar del canal de Cl^- CIC-2 interaccionant directament, localitzant-lo a les unions cel·lulars i modificant les propietats del canal (Jeworutzki et al., 2012) permetent la seva obertura a voltatges positius.

Els resultats obtinguts durant aquesta Tesi han permès classificar les mutacions descrites en *GLIALCAM* en funció del defecte que exhibien. Així doncs, el primer tipus de defecte que poden causar les mutacions en *GLIALCAM* afecta als nivells proteics de la proteïna reduint-los dràsticament (**Figura 80, tipus 1**). En concordança amb els resultats obtinguts en el model *knock-down* i en el ratolí *knock-out* per GlialCAM (Capdevila-Nortes et al., 2013; Hoegg-Beiler et al., 2014), la manca de GlialCAM causada per mutacions en el gen implica una pèrdua de MLC1 funcional, ja que la proteïna MLC1 no és capaç de localitzar-se a la membrana plasmàtica.

Es coneix que GlialCAM forma predominantment dímers en *cis* en el mateix pla de la membrana d'una cèl·lula individual (López-Hernández et al., 2011b; Moh et al., 2005), però mutacions en *GLIALCAM*, provoquen una reducció en la formació d'homodímers en *cis* derivant en la consegüent deslocalització de GlialCAM a les unions cel·lulars (**Figura 80, tipus 2**). Aquests resultats suggereixen que el tràfic de GlialCAM a les unions, així com la interacció en *trans* de GlialCAM depèn directament de la correcta interacció en *cis* a la membrana cel·lular; si aquesta dimerització no es realitza correctament, no serà possible la formació tetramèrica de GlialCAM entre les dues cèl·lules adjacents així com també provocaran la consegüent deslocalització del complex GlialCAM/MLC1 i GlialCAM/CIC-2 a les unions cel·lulars.

Per altra banda, s'ha descrit que el tràfic de GlialCAM a les unions cel·lulars depèn d'interaccions *trans*-homofíliques (Hoegg-Beiler et al., 2014) i s'ha observat una mutació que tot i no mostrar defecte en la formació del dímer de GlialCAM sí que provocava la deslocalització de la proteïna, reduint la seva localització a les unions

cel·lulars i com a conseqüència, també deslocalitzant les proteïnes MLC1 i CIC-2 a aquestes unions (**Figura 80, tipus 3**). Així doncs, la interacció *trans* es pot veure afectada tant per una mala interacció en *cis* que provocarà la deslocalització de la proteïna a la membrana com directament afectant a la superfície d'interacció *trans* entre dues molècules de GlialCAM oposades.

Per últim, s'ha observat que *in vivo* la manca de MLC1 comporta la deslocalització de GlialCAM i CIC-2 en la glia de Bergman (Hoegg-Beiler et al., 2014). Tot i així, en astròcits derivats del ratolí *knock-out* de MLC1 és necessari el tractament d'aquests amb un medi amb alta concentració de K⁺ per reproduir aquesta deslocalització de GlialCAM. Respecte a aquest fet, s'ha observat que mutacions en *GLIALCAM* provoquen la inestabilitat de la proteïna en absència de MLC1 (**Figura 80, tipus 4**). Segurament la manca de MLC1 provoca inestabilitat a la proteïna GlialCAM, suggerint que no només GlialCAM és necessari per estabilitzar MLC1 sinó que MLC1 també pot ser necessari per estabilitzar GlialCAM.

Per altra banda, s'ha observat com certes mutacions en *GLIALCAM* poden modificar aquesta dependència de GlialCAM sobre MLC1 provocant que la manca de MLC1 no forci la internalització de la proteïna i es mantingui estable a la membrana de la cèl·lula (**Figura 80, tipus 5**). Aquestes mutacions podrien exhibir el defecte que provocaria el desenvolupament de la MLC en la seva capacitat de localitzar CIC-2 en les unions cel·lulars únicament en una determinada situació fisiològica.

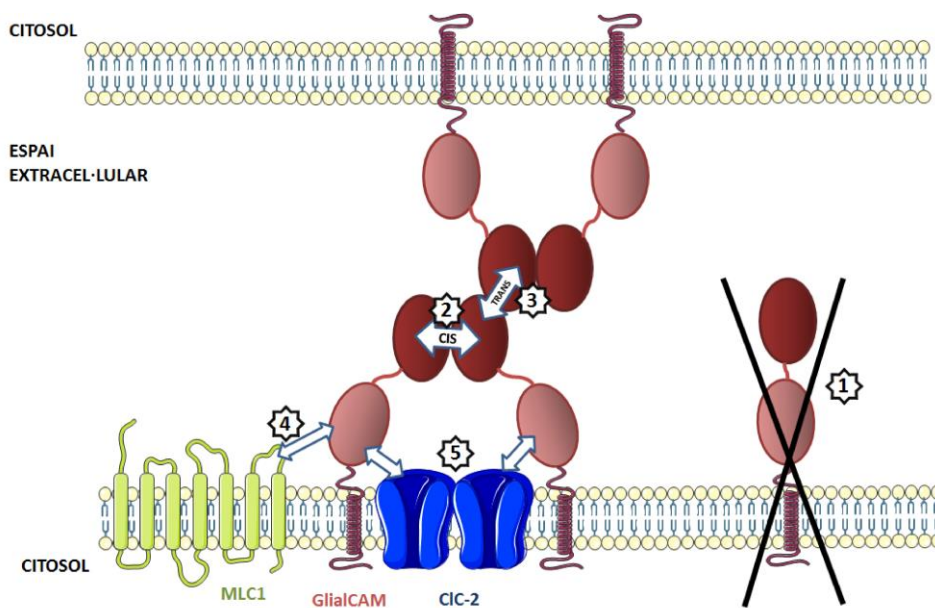


Figura 80. Tipus de defecte causat per les diferents mutacions en *GLIALCAM*. 1) Reducció dels nivells proteics de GlialCAM. 2) Reducció en els nivells d'interacció en *cis* entre molècules de GlialCAM. 3) Tràfic defectiu de GlialCAM a les unions cel·lulars independentment de la correcta interacció en *cis*. 4)

Internalització de la proteïna en absència de MLC1. **5)** Defecte d'interacció entre GlialCAM i CIC-2 en determinades situacions fisiològiques conjuntament amb la manca de MLC1.

Paper de GlialCAM en la biogènesi de CIC-2.

Durant el desenvolupament d'aquesta Tesi es van descriure mutacions en el gen *CLCN2* associades a leucoencefalopaties amb edema intramielínic (LKPAT) (Depienne et al., 2013). Aquests pacients presentaven la formació de vacuoles a les làmines externes de la mielina similars a les observades en els pacients de MLC (van der Knaap et al., 2012) i en el model *knock-out* de CIC-2 (Blanz et al., 2007). Així doncs, juntament amb el fet que GlialCAM actua com a subunitat auxiliar del canal del Cl⁻ CIC-2 (Jeworutzki et al., 2012) ens va fer pensar en una possible implicació de CIC-2 en la malaltia MLC i qüestionar el paper que GlialCAM podria desenvolupar en el procés de formació del complex GlialCAM/CIC-2 en la membrana cel·lular.

A nivell funcional, les mutacions associades a les leucoencefalopaties amb edema intramielínic implicaven una dràstica reducció, en alguns casos total, dels nivells proteics així com de l'activitat del canal CIC-2. Tot i així, GlialCAM mantenia la capacitat d'interaccionar amb CIC-2 i conservava la capacitat d'activar el canal per mitjà de l'obertura del *common gating* de CIC-2. Aquestes mutacions en *CLCN2* també provocaven una major endocitosi de la proteïna i tot i que GlialCAM no reduïa la taxa d'internalització de CIC-2 sí que millorava l'estabilització de la proteïna a la membrana, localització en la qual el complex GlialCAM/CIC-2 tindria lloc i podria modular la funció del canal. A més a més, un defecte d'homooligomerització de GlialCAM i el seu conseqüent tràfic defectiu provocaria la inestabilitat de CIC-2 a la membrana. Aquests resultats suggereixen que la formació del complex entre GlialCAM i CIC-2 no es realitzaria en el reticle endoplasmàtic ajudant a la seva sortida, sinó que tindria lloc a la membrana cel·lular i que l'efecte estabilitzador de GlialCAM sobre els nivells de CIC-2 a la membrana plasmàtica requeriria de la formació prèvia d'un complex GlialCAM/GlialCAM. Per tant, en concordança amb el fet que CIC-2 arriba a la membrana de manera independent de GlialCAM (Cornejo et al., 2009), GlialCAM millora funcionalment al canal de clorur CIC-2 al conferir-li una protecció contra la degradació endo-lisosomal i per tant una major estabilització a nivell de la membrana cel·lular.

Relació bioquímica i funcional entre GlialCAM, MLC1 i CIC-2 en la fisiologia astrocitària.

S'han proposat múltiples funcions de CIC-2 segons el teixit en el que s'expressi però la seva funció *per se* roman desconeguda. Existeixen fortes evidències a favor que CIC-

2, juntament amb GlialCAM i MLC1, exerceixen un paper important en les cèl·lules glials ja que el ratolí *Clcn2^{-/-}*, *GlialCAM^{-/-}* i *MLC1^{-/-}* presenten vacuolització en el cervell similar al fenotip vacuolitzant observat en els pacients de MLC (Blanz et al., 2007) i en els pacients de LKPAT causades per mutacions en *CLCN2* (Depienne et al., 2013).

Defectes en MLC1, GlialCAM i CIC-2 provoquen patologies similars tant en humans com en ratolins. Atès que GlialCAM interacciona tant amb MLC1 com amb CIC-2 i que l'alteració de *GLIALCAM* i *MLC1* afecten la localització i l'expressió proteica de les altres dues proteïnes es suggereix que aquestes tres proteïnes contribueixin en un procés funcional comú. Tot i que GlialCAM interacciona amb MLC1 i CIC-2, podria ser que fisiològicament GlialCAM estigués segregat per MLC1, on les corrents regulades per CIC-2 es mostrarien com quan no està interaccionant amb GlialCAM, ja que les corrents registrades tant en cultius d'astròcits (Ferroni et al., 1997) com en *slices* de cervell (Makara et al., 2003) mostren el patró típic de CIC-2 sol, no mostrant la menor rectificació d'entrada que s'observa quan es coexpressa CIC-2 i GlialCAM. Aquest fet es deu segurament a que la formació del complex GlialCAM/CIC-2 pugui ser necessària només sota condicions especials, com aquelles que es donen durant una alta activitat neuronal en la qual hi ha un alliberament de K^+ a l'espai extracel·lular on CIC-2 seria necessari per a permetre l'entrada de Cl^- a l'interior de la cèl·lula, ja que es coneix que la glia actua recollint l'excés de K^+ que té lloc durant l'elevada activitat neuronal fins a eliminar-la per el corrent sanguini (Rash, 2010) (**Figura 81, procés 1**). Els astròcits exhibeixen una forma d'activació i comunicació entre astròcits i neurones (a través d'unions *gap*) depenent de canvis en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Duffy and MacVicar, 1995) provocats per l'activitat sinàptica neuronal (Dani et al., 1992). Així doncs, l'augment de K^+ intracel·lular provoca la despolarització de la cèl·lula amb la conseqüent activació de canals activats per voltatge positiu, com per exemple els canals de Ca^{2+} i Na^+ , permetent l'entrada de Ca^{2+} a l'interior de la cèl·lula (**Figura 81, procés 2**).

S'ha descrit que *in vivo* MLC1 és indispensable per a la localització de GlialCAM i CIC-2 a la glia de Bergmann (Hoegg-Beiler et al., 2014), però estudis *in vitro* mostren que GlialCAM i CIC-2 només es troben deslocalitzats *in vitro* en absència de MLC1 quan es troben en un medi amb alta concentració de K^+ . Es suggereix que potser *in vitro* manqués alguna o algunes molècules que poguessin intervenir en la deslocalització observada *in vivo* de GlialCAM i CIC-2. Els estudis electrofisiològics realitzats mitjançant la utilització d'astròcits han demostrat que el canal CIC-2 en condicions d'alta concentració de K^+ presenta unes traces molts semblants a les que s'observen quan es sobreexpressa GlialCAM. En aquestes condicions, GlialCAM es podria trobar lliure de MLC1 i recollir CIC-2 en l'aparell de Golgi per a modificar el tràfic

de CIC-2 a les unions cel·lulars formant un complex estable GlialCAM/CIC-2 a la membrana cel·lular, donant lloc a canvis en les propietats de rectificació i activació del canal (**Figura 81, procés 3 i 4**).

A partir d'estudis electrofisiològics on s'inhibia els canals de Ca^{2+} de tipus L o la disponibilitat de Ca^{2+} intracel·lular es va observar que aquest bloqueig provocava una disminució en l'índex d'activació de CIC-2 en el cultiu primari d'astròcits de rata en condicions d'alta concentració de K^+ acompanyat de la retenció de la proteïna a l'espai citoplasmàtic. Aquests resultats suggereixen que al bloquejar l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula o limitar la seva disponibilitat, s'altera el mecanisme per el qual GlialCAM dirigeix i estabilitza CIC-2 a les unions astrocitàries.

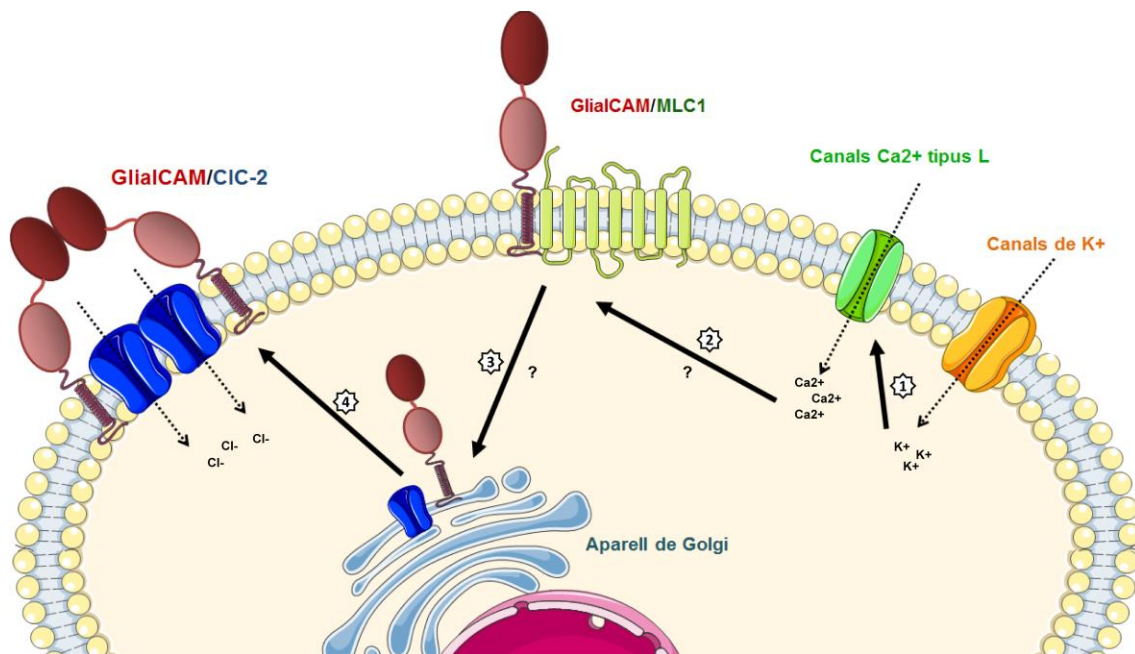


Figura 81. Model representatiu del possible procés fisiològic on participarien GlialCAM, MLC1 i CIC-2. 1) En períodes d'hiperactivitat neuronal es donaria un excés de K^+ extracel·lular que seria captat pels astròcits per mitjà dels canals de K^+ . Aquesta entrada de K^+ despolaritzaria la cèl·lula provocant l'activació de canals de Ca^{2+} de tipus L. 2) MLC1, que estaria formant un complex amb GlialCAM a la membrana cel·lular, percebria aquesta entrada de Ca^{2+} a l'interior de la cèl·lula. 3) MLC1, mitjançant un mecanisme desconegut, provocaria la internalització de GlialCAM on podria recollir CIC-2 en l'Aparell de Golgi. 4) El complex GlialCAM/CIC-2 viatjaria fins a la membrana cel·lular on GlialCAM modularia l'activitat del canal CIC-2 permetent l'entrada de Cl^- per compensar el desequilibri de càrregues.

En resum, com a resultat de l'activitat neuronal, s'allibera K^+ al medi extracel·lular per a repolaritzar el potencial de membrana de la neurona i l'eliminació d'aquest excés per mitjà del procés de *potassium siphoning* és essencial. El K^+ alliberat per les neurones és recollit via canals de K^+ per la red astrogliàl regulada per connexines i eliminada a través dels peus astrocitaris que envolten els vasos sanguinis directament al corrent

sanguini. En aquestes condicions, GlialCAM requereix de MLC1 per a mantenir una correcta localització a la membrana cel·lular i MLC1 pot actuar com a sensor d'aquesta entrada de K^+ a la cèl·lula per posteriorment modificar conformacionalment o alliberar GlialCAM. D'alguna manera GlialCAM, proteïna de membrana, mitjançant un mecanisme que es desconeix es capaç d'internalitzar-se i dirigir CIC-2, que en condicions normals es troba en el Golgi, a la membrana. Aquesta formació del complex GlialCAM/CIC-2 modifica les propietats electrofisiològiques del canal CIC-2 permetent un flux d'entrada de Cl^- quan la cèl·lula es trobi despolaritzada neutralitzant així el flux de K^+ . D'aquesta manera es permetria un transport iònic neutral a través del sinciti glial fins arribar a l'eliminació del K^+ al corrent sanguini. Així doncs, tenint en compte que mutacions en *CLCN2* provoquen leucodistròfies amb edema intramielínic i que la manca de MLC1 provoca la deslocalització de GlialCAM i CIC-2, hipotetitzem que aquesta deslocalització de GlialCAM o la pèrdua de l'efecte estimulador de GlialCAM sobre CIC-2 donarà lloc a un defecte en el transport de Cl^- glial, el qual podria alterar el procés de tamponació del K^+ extracel·lular o la homeòstasi del Cl^- que té lloc durant l'activitat neuronal. Aquest fet desembocaria en una acumulació osmòtica d'aigua que donaria lloc a la vacuolització observada en els pacients afectats per leucoencefalopaties amb edema intramielínic. Per tant, podem concloure que en la MLC, la manca de MLC1 causaria la desregulació de l'activitat VRAC així com del canal CIC-2, en canvi, les LKPAT vindrien únicament causades directament per la desregulació de CIC-2 i per això les característiques clíniques d'aquests trastorns no són iguals.

Tractament per a la fisiopatologia de les leucoencefalopaties vacuolitzants.

Desafortunadament, per a la gran majoria de patologies que afecten a la mielina, es desconeix el mecanisme patològic. En base als resultats obtinguts amb aquest treball i juntament amb resultats previs del grup es podria intentar realitzar teràpia gènica, tal com s'ha descrit per a la malaltia de Krabbe o per a la Adrenoleucodistròfia. Mitjançant vectors virals (adenoassociats o lentivirus) es podria reincorporar de nou la proteïna MLC1 o GlialCAM, en el cas de la MLC, així com la proteïna CIC-2, en leucodistròfies causades per mutacions en *CLCN2*, per intentar revertir el fenotip vacuolitzant en els estadis primerencs de la malaltia, on el procés de mielinització està més actiu i és quan els pacients mostren l'edema intramielínic però encara no presenten cap afectació clínica.

CONCLUSIONS

1. S'ha obtingut una classificació de les mutacions en *GLIALCAM* en funció del defecte que presentaven, la qual ha permès avançar en la fisiopatologia de la MLC. S'ha descrit mutacions defectives en la expressió proteica, defectives en la homooligomerització i en el tràfic a les unions cel·lulars, defectives únicament en el tràfic cel·lular, mutacions sensibles a la manca de MLC1 i mutacions defectives en la internalització de la proteïna.
2. GlialCAM augmenta la funció del canal CIC-2 a través de la modificació del *gating* del canal i de la estabilització de CIC-2 a la membrana plasmàtica però no sembla que millori la sortida de CIC-2 del reticle endoplasmàtic. A més, aquesta estabilització requereix de la formació d'homocomplexes de GlialCAM.
3. En astròcits en cultiu en condicions d'alta concentració de K^+ , similar al que succeiria en situacions d'alta activitat neuronal, CIC-2 es localitza a les membranes cel·lulars, modificant les seves propietats funcionals per l'efecte de GlialCAM. En canvi, en astròcits deficients de MLC1, CIC-2 es troba retinguda citoplasmàticament. Aquest fet, indicaria que aquestes proteïnes podrien tenir un paper en el procés de sifoneig del K^+ , i per tant, la deslocalització de CIC-2 podria donar lloc a un desordre en l'homeòstasi d'aigua i ions.
4. Els canals de Ca^{2+} de tipus L jugarien un paper en el mecanisme per el qual, en condicions d'alta concentració de K^+ , la proteïna CIC-2 es transloca des de l'aparell de Golgi fins a la membrana plasmàtica.