

Avenços en la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb Quists subcorticals



Anna Duarri Piqué

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
UAB, 2010

**AVENÇOS EN LA FISIOPATOLOGIA
DE LA LEUCOENCEFALOPATIA
MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS
SUBCORTICALS**

Tesi doctoral: Anna Duarri Piqué

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,
UAB 2010**

Directors:

Raúl Estévez Povedano i Virginia Nunes Martínez

Departament de Ciències Fisiològiques II, UB

Tutor:

José Miguel Lizcano de Vega

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
(RD 778/1998)

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Memòria presentada per optar al grau de doctor per la Universitat Autònoma
de Barcelona, 2010

ANNA DUARRI PIQUÉ

La interessada,

Anna Duarri Piqué

Els directors de la tesi,

Raúl Estévez Povedano

Virginia Nunes Martínez

Departament de Ciències Fisiològiques II, UB.

El tutor de la tesi,

José Miguel Lizcano de Vega

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB

ÍNDIX GENERAL

INTRODUCCIÓ

1. EL SISTEMA NERVIÓS EN TERMES GENERALS	1
1.1. Sistema nerviós central i sistema nerviós perifèric	1
1.2. Les cèl·lules del teixit nerviós	2
1.2.1. Microglia	2
1.2.2. Cèl·lules endodials i unitat neurovascular	3
1.2.3. Oligodendròcits i mielina	4
1.2.4. Neurones	6
2. ASTRÒCITS I REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR	7
2.1. Astròcits	7
2.2. Proteïnes del citoesquelet	8
2.3. Funcions dels astròcits	8
2.4. Paper dels astròcits en condicions patològiques	10
2.5. Regulació del volum cel·lular	12
3. CITOESQUELET I TIPUS D'UNIONS CEL·LULARS	16
3.1. Citoesquelet cel·lular	16
3.2. Unions cel·lulars	16
3.3. Complex distrofina-glicoproteïna (DGC)	21
4. LEUCODISTRÒFIES	24
4.1. Classificació de les leucoencefalopaties	24
4.2. Leucodistròfies amb disfunció astrocitària	25
5. LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS	
SUBCORTICALS	27
5.1. Característiques clíniques de la malaltia	27
5.2. El gen <i>MLC1</i>	30
5.3. La proteïna MLC1	33
5.4. Tractament dels pacients de MLC	37
5.5. Diagnòstic prenatal	37

OBJECTIUS **39**

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNiques EN BIOLOGIA MOLECULAR	41
1.1. Clonatge del DNA plasmídic	41
1.2. Bactèries, electrocompetents i transformació del DNA	54
1.3. Obtenció i purificació del DNA	55

1.4.	Obtenció de RNA, <i>real time</i> -PCR i MicroArrays	57
2.	TÈCNIQUES EN BIOLOGIA DE PROTEÏNES	59
2.1.	Obtenció de la proteïna total	59
2.2.	Tècnica de Western-Blot	62
2.3.	Immunocitoquímica	66
2.4.	Obtenció d'anticossos policlonals	67
2.5.	Obtenció de proteïnes de fusió	70
2.6.	Immunoprecipitació	72
3.	CULTIUS CEL·LULARS	76
3.1.	Línies cel·lulars	76
3.2.	Cultius primaris	77
3.3.	Transfecció de cèl·lules	80
3.4.	Producció d'Adenovirus	81
3.5.	Mesura de l'expressió en superfície de proteïnes de membrana pel mètode de luminiscència en astròcits	85
4.	TÈCNIQUES D'IMATGE	86
4.1.	Anàlisi de la colocalització	86
4.2.	Determinació de la difusió cel·lular	86
4.3.	Monitorització del volum per fluorescència	87
4.4.	Mesura del flux de sortida cel·lular del D-H ³ -Aspartat	92
5.	APÈNDIX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL	94

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1. MODEL DE RATOLÍ <i>KNOCK-OUT</i> CONDICIONAL DE <i>Mlc1</i>	97
1. Disseny de l'estratègia	97
2. Construcció del vector de recombinació	98
3. Discussió	99
CAPÍTOL 2. CARACTERITZACIÓ DE MLC1 HUMÀ	100
1. Obtenció i caracterització dels anticossos contra la proteïna MLC1 humana	100
2. Expressió de MLC1 en diferents teixits humans	102
3. Distribució de MLC1 en diferents regions del cervell humà	103
3.1. MLC1 en cervell humà adult	103
3.2. MLC1 en cervell humà fetal	103
4. Estudi de l'expressió de MLC1 relacionat amb diferents patologies en humà i en rata	104
4.1. Model de rata epilèptica induïda per àcid kainic	104

4.2.	Expressió de MLC1 en glioblastomes humans	105
4.3.	Expressió de MLC1 en infarts cerebrals humans	106
5.	Discussió	107
 CAPÍTOL 3. MODELS CEL·LULARS PER L'ESTUDI DE MLC1		108
1.	Recerca d'una línia cel·lular que expressi MLC1 endògenament	108
2.	Caracterització del model d'astròcits i expressió de MLC1	109
2.1.	Caracterització del model d'astròcits de rata	109
2.2.	Localització de MLC1 a unions astrocitàries	112
2.3.	Colocalització de MLC1 amb proteïnes del complex distrofina-glicoproteïna (DGC)	115
2.4.	Relació de MLC1 amb el citoesquelet	117
2.5.	Model cel·lular d'astròcits humans fetals	120
2.6.	Característiques funcionals del model astrocitari	121
3.	Model neuronal de MLC1	123
3.1.	Model neuronal de rata	123
3.2.	Expressió de MLC1 en neurones fetals humanes	124
4.	Discussió	125
 CAPÍTOL 4. ESTUDI DELS MUTANTS DE MLC1 EN EL MODEL ASTROCITARI I EN PACIENTS DE MLC		127
1.	Estudi dels mutants en el model astrocitari	127
1.1.	Estudi de la localització dels mutants de MLC1 en astròcits de rata	127
1.2.	Caracterització del mutant S246R en astròcits utilitzant Adenovirus	129
1.3.	Estabilitat proteica del mutant S246R respecte el wt	130
2.	Expressió de MLC1 en pacients de MLC	132
2.1.	Expressió de MLC1 a PBLs	132
2.2.	Estudi dels mutants de MLC1 en pacients de MLC	132
3.	Discussió	134
 CAPÍTOL 5. MODELS CEL·LULARS <i>KNOCK-DOWN</i> I DE SOBREEXPRESSIÓ DE MLC1		135
1.	Caracterització del model astrocitari <i>knock-down</i> de MLC1	135
1.1.	Caracterització dels miRNAs en el model astrocitari	135
1.2.	Estudi de les unions astrocitàries en el model <i>knock-down</i>	137
2.	Model de complementació i morfologia cel·lular	138
2.1.	Model de complementació	138
2.2.	Morfologia cel·lular i vacuoles	140

2.3.	Relació de MLC1 amb el volum cel·lular	142
3.	Regulació del volum cel·lular en el model de sobreexpressió i <i>knock-down</i> de MLC1	143
3.1.	RVD per la tècnica d'imatge amb calceina	143
3.2.	Transport de Cl ⁻ / I ⁻ detectat per canvis en la fluorescència intracel·lular de la proteïna YFP-H148Q/I152L	145
3.3.	RVD mesurant la sortida de [H ³]-D-Aspartat	146
4.	<i>Microarrays</i> del model astrocitari <i>knock-down</i>	147
4.1.	Dades del <i>microarray</i>	147
5.	Discussió	149
 DISCUSSIÓ GENERAL I HIPÒTESI		 151
 CONCLUSIONS		 153
 BIBLIOGRAFIA		 155
 ANNEXOS		
Annex 1.	Localització de MLC1 de ratolí i d'humà en unions astrocitàries en teixit	169
Annex 2.	Immunohistoquímiques de MLC1 en cervell de ratolí wt en comparació amb cervells procedents de diferents ratolins distròfics	170
Annex 3.	Imatges de microscopia electrònica d' <i>immunogold</i> de MLC1 a teixit humà	171
Annex 4.	Article (Duarri et al., 2008)	172
Annex 5.	Article (Duarri et al.)	184

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ

- Figura 1. Imatge d'una cèl·lula de microglia (pàgina 2)
- Figura 2. Unitat neurovascular (pàgina 3)
- Figura 3. Estructura de la mielina (pàgina 4)
- Figura 4. Representació d'una neurona (pàgina 6)
- Figura 5. Micrografia electrònica on es mostra un astròcit en contacte amb terminals axonals fent sinapsis asimètriques amb 4 espines (pàgina 7)
- Figura 6. Model esquemàtic del mecanisme molecular involucrat en la resposta als canvis de volum (pàgina 14)
- Figura 7. La resposta homeostàtica per mantenir el volum cel·lular està dirigida per canvis en l'activitat dels canals i dels transportadors iònics (pàgina 15)
- Figura 8. Representació dels diferents tipus d'unions en una cèl·lula epitelial (pàgina 17)
- Figura 9. Representació esquemàtica del DGC (pàgina 22)
- Figura 10. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC i un control (pàgina 28)
- Figura 11. Microfotografies d'un pacient de MLC que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca subcortical (pàgina 29)
- Taula 1. Mutacions identificades en el gen *MLC1* en pacients amb MLC (pàgina 30)
- Figura 12. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1 humana, segons prediccions bioinformàtiques (pàgina 33)
- Figura 13. Alineament de la seqüència de la proteïna MLC1 en 13 espècies diferents (pàgina 34)

MATERIALS I MÈTODES

- Figura 14. Esquema gràfic del mètode de mutagènesi per PCR SOE (pàgina 42)
- Figura 15. Esquema del sistema de clonació Gateway (pàgina 46)
- Figura 16. Esquema de la reacció de recombinació *multisite* de 2 fragments (pàgina 48)
- Figura 17. Representació esquemàtica de la recombinació ET (pàgina 50)
- Figura 18. Via de la biogènesi dels miRNA en cèl·lules eucariotes (pàgina 51)
- Figura 19. Purificació de l'anticòs MLC1 N5 (pàgina 69)
- Figura 20. Producció de les proteïnes de fusió Nt-MBP i NusA-Ct (pàgina 71)
- Figura 21. Purificació de l'anticòs MLC1 Nt (pàgina 75)
- Figura 22. Vector d'expressió d'adenovirus pAd/CMV/V5-DEST compatible amb el sistema Gateway (pàgina 82)
- Taula 2. Adenovirus generats (pàgina 86)
- Gràfica 1. Gràfica de la fluorescència vs. el gradient osmòtic per calcular el *background* relatiu (pàgina 89)
- Gràfica 2. Perfils de fluorescència de la calceïna en astròcits sotmesos a diferents condicions osmòtiques (pàgina 90)
- Gràfica 3. Perfil de fluorescència de la calceïna en astròcits control per estudiar la recuperació del volum (RVD) en condicions hipoosmòtiques (pàgina 91)

RESULTATS

Capítol 1

- Figura 23. Esquema del disseny que es va seguir per l'obtenció del vector de recombinació i per la generació del ratolí KO condicional de *Mlc1* (pàgina 97)
- Figura 24. Esquema dels passos necessaris per a la construcció del vector de recombinació (pàgina 98)
- Figura 25. Esquema de l'estratègia que l'empresa ICS ha seguit per generar el ratolí *knock-out* condicional de MLC1 (pàgina 99)

Capítol 2

- Taula 3. Resum dels resultats de cada anticòs en les diferents tècniques testades (pàgina 100)
- Figura 26. Prova dels anticossos MLC1 N4 i N5 per WB i IP (pàgina 101)
- Figura 27. Immunohistoquímica de teixit humà amb l'anticòs MLC1 Nt per DAB (pàgina 102)
- Figura 28. Imatge de microscopia electrònica en teixit de cervell humà on es mostren el marcatge de l'anticòs N5 unit a partícules d'or de 18 nm (pàgina 102)
- Figura 29. WB de diversos teixits humans on es detecta MLC1 amb l'anticòs N4 (pàgina 103)
- Figura 30. WB de les diferents regions del cervell humà detectant la proteïna MLC1 humana amb l'anticòs N4 (pàgina 103)
- Figura 31. Expressió de MLC1 a cervell fetal humà (pàgina 104)
- Figura 32. Expressió de MLC1 en el model de rata d'epilèpsia induïda per àcid kainic (pàgina 105)
- Taula 4. Dades de les mostres de teixit control i glioblastomes, on s'especifica el sexe del pacient i l'edat (pàgina 105)
- Figura 33. WB on es mostren 4 controls i 4 glioblastomes, on es detecta la proteïna MLC1 amb l'anticòs Nt (pàgina 105)
- Gràfica 4. Representació de la quantificació de la intensitat de les bandes del WB (pàgina 106)
- Figura 34. Expressió de MLC1 en infarts cerebrals humans (pàgina 107)

Capítol 3

- Figura 35. Estudi de l'expressió de MLC1 en diferents línies cel·lulars amb l'anticòs N4 (pàgina 108)
- Figura 36. Expressió de MLC1 en el cultiu d'astròcits primaris de rata (pàgina 109)
- Figura 37. WB on es mostra l'expressió de MLC1 en extractes de cultius d'astròcits i cultius mixtos amb neurones en presència d'Ara-C (pàgina 110)
- Figura 38. Localització subcel·lular de MLC1 en diferents condicions de cultiu d'astròcits primaris (pàgina d'hipocamp de rata per immunocitoquímica amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí (pàgina 111)
- Figura 39. Localització cel·lular i expressió de MLC1 en cultius d'astròcits tractats amb dB-AMPC (pàgina 112)
- Figura 40. Dobles immunocitoquímiques en el cultiu primari d'astròcits de rata entre MLC1 i diferents proteïnes d'unions (pàgina 113)
- Figura 41. Co-immunoprecipitacions astròcits de rata on s'immunoprecipita amb MLC1 i es detecten diverses proteïnes d'unions (pàgina 114)
- Figura 42. Expressió de GlialCAM en el model astrocitari i interacció amb MLC1 (pàgina 115)
- Figura 43. Colocalització de MLC1 amb proteïnes del complex distrofina-glicoproteïna (DGC) (pàgina 116)
- Figura 44. Colocalitzacions entre MLC1 i les proteïnes del citoesquelet en astròcits (pàgina 118)

- Figura 45. Expressió de MLC1 en teixits cerebrals d'Alexander (pàgina 119)
- Figura 46. Distribució de MLC1 en els processos astrocitaris (pàgina 119)
- Figura 47. Localització i expressió de MLC1 en cultius primaris d'astròcits humans fetals (pàgina 120)
- Figura 48. Imatges de fluorescència de dos cultius d'astròcits, un en creixement i l'altre en quiescència on s'hi ha realitzat la tècnica de *scrape-loading* (pàgina 122)
- Gràfica 5. Representació de la mesura de la resistència elèctrica transepitelial (TEER) dels diferents cultius (pàgina 123)
- Figura 49. Caracterització de l'expressió i la localització de MLC1 en un cultiu neuronal de rata (pàgina 124)
- Figura 50. Estudi de l'expressió i localització de MLC1 en un cultiu de neurones humanes fetals (pàgina 125)

Capítol 4

- Figura 51. Immunocitoquímica d'un cultiu d'astròcits cotransfectats amb la PH-GFP i MLC1 wt o els mutants S246R, G59E, S245P i S280L detectats amb l'anticòs HA (pàgina 128)
- Figura 52. Expressió de MLC1 i el mutant S246R en el model d'astròcits (pàgina 129)
- Figura 53. Immunocitoquímica d'un cultiu mixt d'astròcits i neurones infectats amb l'AdV que expressa la proteïna MLC1 wt i el mutant S246R (pàgina 130)
- Figura 54. Estabilitat proteica i nivells de proteïna a membrana (pàgina 131)
- Figura 55. Estudi de l'expressió de MLC1 en leucòcits de sang perifèrica (pàgina 132)
- Figura 56. Estudi de MLC1 en pacients de MLC (pàgina 133)

Capítol 5

- Figura 57. Anàlisi de la reducció de l'expressió de la proteïna MLC1 utilitzant els miRNAs (pàgina 136)
- Gràfica 6. Estudi dels nivells de mRNA de MLC1 per RT-PCR (pàgina 136)
- Figura 58. Estudi dels canvis en la morfologia dels astròcits deficitaris de MLC1 (pàgina 137)
- Figura 59. Estudi de les unions astrocitàries en absència de MLC1 (pàgina 138)
- Figura 60. Model astrocitar de sobreexpressió de MLC1 (pàgina 139)
- Gràfica 7. Quantificació de l'àrea cel·lular dels astròcits control comparada amb l'àrea dels astròcits que sobreexpressen MLC1 (pàgina 139)
- Figura 61. Model de complementació de MLC1 (pàgina 140)
- Gràfica 8. Quantificació de l'àrea cel·lular (pàgina 141)
- Figura 62. Imatges de fluorescència de la GFP corresponent als astròcits infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 (pàgina 141)
- Gràfica 9. Recuperació del fenotip cel·lular del model de complementació (pàgina 142)
- Figura 63. Canvi de localització de MLC1 en el model astrocitar en diferents condicions osmòtiques (pàgina 142)
- Taula 4. Dades d'inflament dels astròcits i recuperació del volum en presència o absència de MLC1 (pàgina 143)
- Gràfica 10. Regulació del volum cel·lular del model astrocitar en condicions hipoosmòtiques sense o amb inhibidor tamoxifen (pàgina 144)
- Figura 64. Imatges de fluorescència corresponents a la calceïna en els astròcits control, sobreexpressant MLC1 o deficitaris en condicions fisiològiques i hipoosmòtiques (pàgina 145)
- Gràfica 11. Perfils d'intensitats de fluorescència de la YFP-H148Q/I152L en els astròcits en diferents

condicions d'osmolaritat i de composició iònica (pàgina 146)

Gràfica 12. Perfils de la sortida de [H^3]-D-Aspartat dels astròcits amb o sense MLC1 en condicions fisiològiques o hipoosmòtiques en el temps (pàgina 147)

Taula 5. Microarrays del model *knock-down* de MLC1 (pàgina 148)

DISCUSSIÓ GENERAL I HIPÒTESI

Figura 65. Esquema del paper dels astròcits en el control iònic de l'espai extracel·lular al voltant de les sinapsis neuronals (pàgina 152)

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

L'objectiu de la present tesi és avançar en el coneixement de la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals. Aquesta malaltia és un tipus de leucodistròfia neurodegenerativa amb deteriorament de les funcions motores que afecta la mielina. En la introducció, primer es descriu de forma general, el context on es desenvolupa la malaltia, que és el sistema nerviós i les cèl·lules que el formen. En segon lloc, es descriuen, més detalladament, els astròcits i el seu paper en el sistema nerviós central, ja que és on s'expressa principalment la proteïna d'interès i on s'han realitzat la majoria d'experiments. Aquesta part s'acompanya d'un petit resum dels diferents tipus d'unions cel·lulars. En tercer lloc, es classifiquen les leucodistròfies i es descriuen aquelles que impliquen als astròcits. Per últim, es fa una descripció detallada dels aspectes clínics i moleculars de la malaltia.

1. EL SISTEMA NERVIÓS

El sistema nerviós dirigeix un gran ventall de processos, com el funcionament dels òrgans interns, la memòria, el pensament, l'aprenentatge, i els processos voluntaris i involuntaris de l'organisme. El sistema nerviós es classifica, de manera simplificada, en: el Sistema Nerviós Central (SNC), constituït per l'encèfal i la medul·la espinal; i el Sistema Nerviós Perifèric (SNP), format pels nervis cranials, pels nervis perifèric que surten de la medul·la i les seves ramificacions.

1.1. SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I PERIFÈRIC

El SNC és el responsable de les necessitats vitals, la coordinació general i la resposta a estímuls. Està format per l'encèfal i la medul·la espinal, els quals es troben protegits per les meninges (duramare, piamare i aracnoides); i per l'envolta òssia, que consisteix en el crani i la columna vertebral. Tant l'encèfal com la medul·la espinal estan constituïts per la substància gris, formada per les dendrites i somes neuronals que processen la informació i per la substància blanca, composta principalment per les prolongacions nervioses (axons mielinitzats), que són els responsables de transmetre la informació.

L'encèfal és una estructura tova amb ventricles per on flueix el líquid cefalorraquidi que serveix d'intercanviador de substàncies i de sistema d'eliminació de residus. El líquid cefalorraquidi també és l'encarregat de mantenir l'equilibri iònic i serveix d'amortiguador de l'encèfal dins de la cavitat cranial. Funcionalment, l'encèfal es divideix en tres parts: el cervell, encarregat de controlar i regular el funcionament del sistema nerviós, rebre estímuls i generar les respostes adients; el cerebel, que controla el funcionament motor del múscul esquelètic; i el tronc encefàlic (bulb raquidi o medul·la obloga), que estableix la comunicació directa entre el cervell i la medul·la espinal, regula el funcionament del cor i dels músculs respiratoris, entre d'altres. La medul·la espinal està formada pel cordó nerviós que continua a partir del bulb raquidi.

El SNP està constituït pel conjunt de nervis i ganglis nerviosos, que envien i reben la informació de les vísceres, múscul esquelètic i òrgans dels sentits, connectant-los amb el SNC. Aquest es divideix en el 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 el sistema simpàtic, que realitza accions amb una despesa d'energia (utilitzant com a neurotransmissor la noradrenalina); i el sistema parasimpàtic, encarregat d'emmagatzemar l'energia (utilitzant l'acetilcolina com a neurotransmissor).

1.2. LES CÈL·LULES DEL TEIXIT NERVIÓS

Tot el teixit nerviós, tant el central com el perifèric, està format majoritàriament per dues classes de cèl·lules: les neurones i les cèl·lules glials. La glia es pot dividir en dos tipus: la microglia i la macroglia, aquesta última formada per les cèl·lules endodimials, els astròcits i els oligodendròcits.

En els següents paràgrafs es fa una petita introducció de cada tipus cel·lular i de les seves funcions en el sistema nerviós.

1.2.1. Microglia

La microglia constitueix el sistema immunològic del SNC. Està formada per cèl·lules petites amb un cos dens i allargat, i unes prolongacions ramificades (figura 1). S'originen com a precursors a la medul·la òssia, i arriben al SNC a través de la sang en forma de cèl·lules fagocítiques, derivades de macròfags, on poden romandre en baix nombre i en estat quiescent durant llargs períodes. Quan en el medi apareixen productes de secreció com citoquines, aminoàcids excitatoris o radicals lliures degut a una infecció o un trauma, la microglia s'activa expressant una gran varietat d'antigens, constituint el sistema de defensa i de reparació del SNC. Però la microglia també pot provocar la destrucció del teixit neuronal segons el balanç de senyals (Hanisch and Kettenmann, 2007).

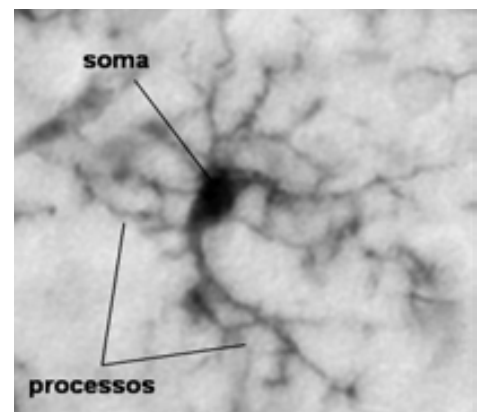


Figura 1. Imatge d'una cèl·lula de microglia on s'observa un cos dens i petit i unes llargues prolongacions (imatge modificada de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/nervous/nervous.htm>).

1.2.2. Cèl·lules endodimials i unitat neurovascular

Les cèl·lules endodimials juntament amb la musculatura llisa, els astròcits i les neurones perivasculars, constitueixen la unitat neurovascular. Les grans artèries cerebrals es ramifiquen en artèries més petites i arterioles repartides per la superfície del cervell (artèries pials), i quan aquestes penetren en el cervell, es converteixen en arterioles i capil·lars intracerebrals, on la membrana vascular de les cèl·lules endodimials entra en contacte amb els processos astrocitaris

(figura 2). L'objectiu principal de la unitat neurovascular és proporcionar defenses, proveir el cervell d'energia i mantenir l'homeostasi del microentorn cerebral. Les cèl·lules endodials constitueixen l'epiteli cerebral. Estan interconnectades amb elles mateixes per unions adherents, unions *gap* i unions *tight* que formen la barrera hematoencefàlica. L'epèndima confereix una barrera per la filtració de molècules, protegeix el cervell de substàncies perjudicials que provenen del fluid cerebroespinal (CSF) i proporciona una dispersió correcta dels missatgers neuronals en el SNC. Les cèl·lules endodials també produeixen substàncies vasoactives: vasodilatadors com l'òxid nítric (NO), la prostaciclina, el monòxid de carboni, i vasoconstrictors com l'endotelina. Aquestes substàncies són utilitzades per la musculatura llisa per provocar els canvis en el diàmetre del vas sanguini i conseqüentment, canvis en la pressió sanguínia intracranial.

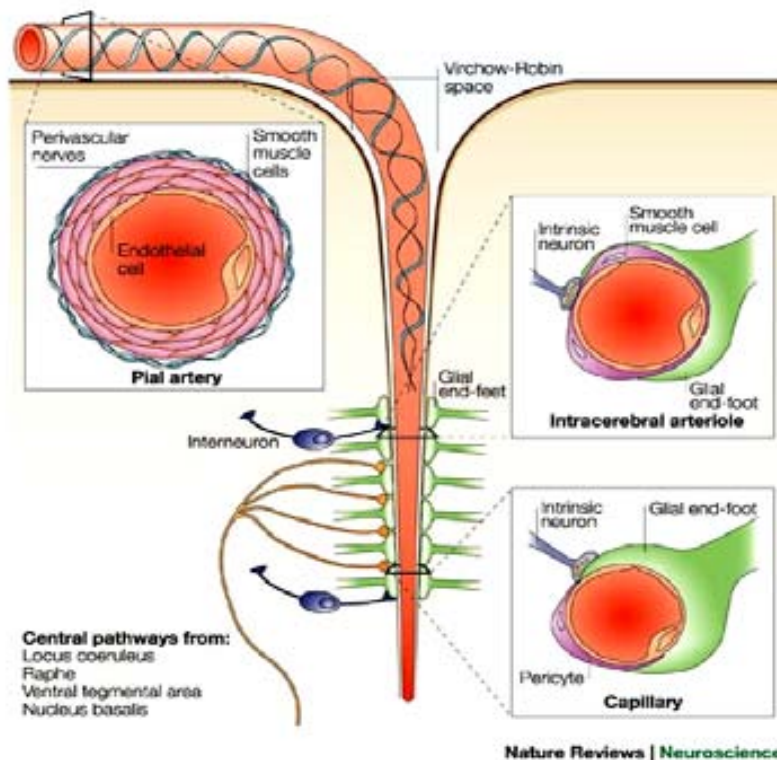


Figura 2. Unitat neurovascular on es representen les artèries pials que s'introdueixen cap a l'interior del cervell pels espais de Virchow-Robin, on es converteixen en artèrioles. La membrana vascular de les artèrioles entra en contacte directa amb els peus astrocítics. Els requadres representen les seccions en cada zona on es mostra la composició de les artèries, formades per les cèl·lules endotelials, múscul llis o l'adventícia; les artèrioles, formades per l'endoteli, el múscul llis, els peus astrocitaris i les neurones intrínseques; i els capil·lars formats per l'endoteli, els pericits, els peus astrocitaris i les interneurons.

L'homeostasi i la pressió intracranial també estan regulades pels astròcits i les neurones. Els processos astrocitaris que rodegen l'epiteli vascular són rics en canals de potassi (Kir4.1), canals d'aigua (aquaporina-4) i receptors purinèrgics P2Y. Aquests canals i receptors juguen un paper clau en el control de la permeabilitat de l'aigua de la barrera hematoencefàlica. Les artèries pials també es troben innervades per neurones perivasculars (interneurones i neurones intrínseques) que contenen vasodilatadors (NO, acetilcolina, etc.) i vasoconstrictors (noradrenalina, neuropeptid Y (NPY) i serotonina) (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006; Iadecola, 2004; Kim et al., 2006).

1.2.3. Oligodendròcits i mielina

Els oligodendròcits són cèl·lules amb un cos petit i condensat i unes prolongacions llargues i ramificades. La funció principal dels oligodendròcits és la formació de la mielina que recobreix els axons neuronals. Cada prolongació oligodendrocítica envolta un segment d'un axó, enrotllant-se sobre sí mateixa i formant les diferents capes de la mielina. Abans del procés de mielinització, però, els oligodendròcits passen per diferents processos de maduració i, en cadascun d'ells, expressen diferents marcadors. La maduració no depèn de la presència de neurones encara que el desenvolupament i manteniment dels oligodendròcits madurs està influenciat pels senyals derivats dels astròcits i de les neurones. S'ha descrit que la meitat dels oligonucleòtids NG2⁺ pertanyen al subgrup excitable sinàpticament (Otis and Sofroniew, 2008).

La mielina consisteix en 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 SNP. La superposició de la membrana plasmàtica, que rodeja l'axó, forma una estructura periòdica de capes concèntriques alternades. Aquestes capes són electrodenses (membranes fusionades), i clares o línies interperiòdiques (fusió de l'espai extracel·lular), les quals formen una estructura laminar compacta que configura l'envolta de mielina madura (figura 3).

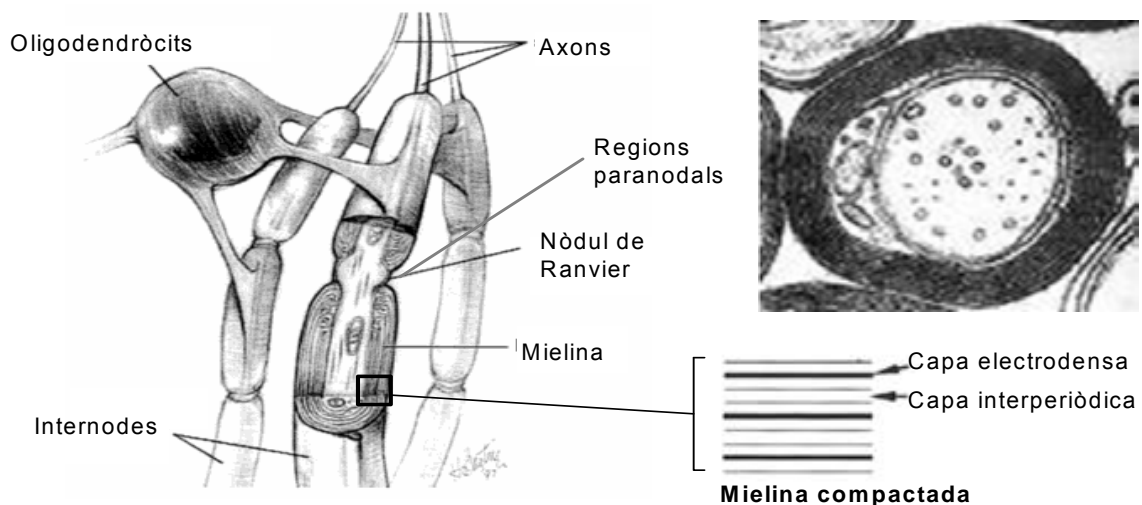


Figura 3. Estructura de la mielina. A l'esquerra, es mostra un esquema d'un oligodendròcit, les extensions citoplasmàtiques del qual donen lloc als diferents segments de mielina, cadascun d'ells en un axó diferent. A la dreta, es mostra l'ultraestructura per microscopia electrònica que correspon al tall transversal d'una fibra nerviosa mielinitzada en el qual es distingeixen les diferents capes de la mielina compactada (esquema, a sota).

Cada beina de mielina es troba situada al llarg dels axons en segments anomenats internodes, els quals confereixen aïllament elèctric a l'axó. Els espais no mielinitzats entre internodes s'anomenen Nòduls de Ranvier, en ells 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, anomenat conducció saltatòria, permet que la transmissió de l'impuls nerviós sigui ràpida i amb una mínima despesa d'energia, al contrari del que passa en axons desmielinitzats, on l'impuls és continu i lent, i amb una elevada despesa energètica. En les regions paranodals, existeixen unions

del tipus *gap*, les quals estan implicades en el transport de substàncies a través de la mielina des de la matriu extracel·lular cap a l'axó, i viceversa. Això fa que es mantingui l'homeostasi iònica i es regulint les propietats elèctriques paranodals durant la conducció saltatòria. Les unions *gap* estan formades per connexines. Un funcionament defectuós d'aquestes proteïnes provoca trastorns relacionats amb la mielina.

La mielina del SNC està composta bàsicament per lípids (70%) i per proteïnes (30%), fet que li dóna la propietat aïllant.

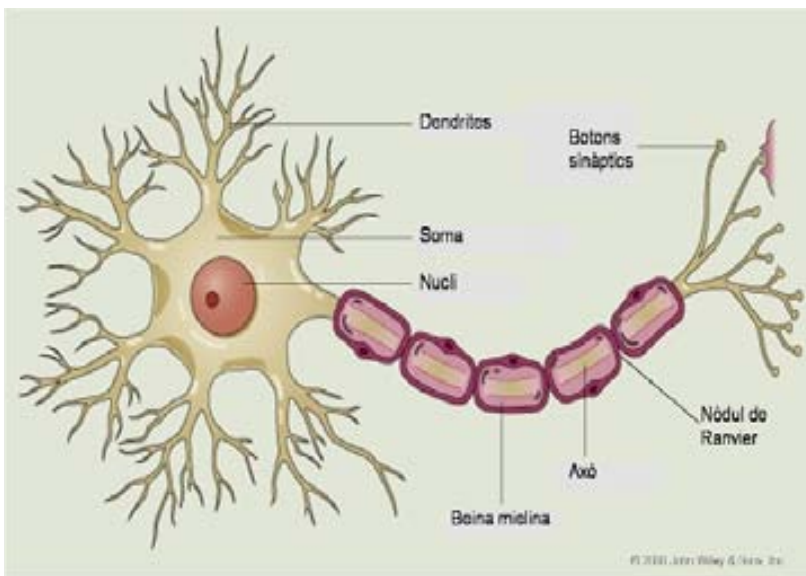
- Lípids: el grup majoritari de lípids són els fosfolípids. Una altra classe de lípids menys abundants són els esfingolípid, glicolípid i el colesterol. Aquest últim confereix rigidesa a la mielina i disminueix la permeabilitat de les molècules solubles.
- Proteïnes: representen un 30% del pes sec i són totalment específiques dels oligodendròcits i de la mielina. Les proteïnes més abundants són la proteïna bàsica de la mielina (MBP), la proteolípida (PLP) i una isoforma de DM20. Un altre grup són les denominades proteïnes de Wolfgram, com la CNPasa. La mielina també està formada per glicoproteïnes, com la glicoproteïna associada a la mielina (MAG) i la glicoproteïna de la mielina/oligodendròcits (MOG). Aquestes pertanyen a una superfamília relacionada amb les immunoglobulines les quals funcionen com a molècules d'adhesió i reconeixement. A la mielina també s'hi troben connexines, com la connexina 32 (Cx32) i la Cx46.6.

La mielina actua com a aïllant elèctric, fet que afavoreix la conducció saltatòria de l'impuls nerviós. No obstant això, també se li han associat altres papers relacionats amb el desenvolupament i el manteniment de l'axó, així com la inhibició del creixement axonal i la seva regeneració.

Els axons mielinitzats conformen la substància blanca, la qual ocupa més de la meitat del cervell humà. S'ha observat que tant les mutacions en els gens relacionats amb la mielina, com els canvis en l'estructura de la substància blanca, causen una gran varietat de desordres neurològics (com la paràlisi, la disfunció motora, l'impediment cognitiu, el retard mental) i desordres psiquiàtrics (com la dislèxia, el desordre bipolar, la depressió, l'autisme, l'esquizofrènia). La mielina pot ser danyada per malalties autoimmunes (com ara el síndrome de Guillain-Barré en el SNP i l'esclerosi múltiple en el SNC), per desordres hereditats que afecten als gens estructurals de la mielina (com les malalties de Charcot-Marie-Tooth, Dejerine-Sottas i Pelizeaus-Marzbacher), per desordres metabòlics (com en les malalties de Canavan, Menke, Krabbe i Refsum) i per infeccions, trauma, toxines, desajust hormonal i asfíxia (Fields, 2008).

1.2.4. Neurones

La unitat estructural del sistema nerviós són les neurones, a través de les quals es transmet l'impuls elèctric. Les neurones en un individu madur no es divideixen, excepte en unes àrees molt concretes, fet que explica perquè moltes lesions cerebrals són definitives. D'acord amb la funció que fan, les neurones es poden classificar en: les neurones sensorials, que són les receptors i condueixen l'impuls nerviós fins al SNC; les neurones motores, que són les emissores de l'impuls elèctric i porten l'ordre des del SNC als efectors (músculs, òrgans,...); i les intereurones, que uneixen dues o més neurones.



Les neurones estan formades per tres parts: el cos neuronal o soma, una prolongació llarga i poc ramificada anomenada axó i les dendrites, que són prolongacions més curtes i molt ramificades al voltant del soma (figura 4).

Figura 4. Representació d'una neurona, on s'observa el soma, les dendrites, l'axó mielinitzat i els botons sinàptics (imatge modificada de <http://www.utexas.edu/courses/bio365r/documents/about/about.php>)

Les neurones s'organitzen en xarxes i sistemes, i la comunicació entre elles es fa a través de contactes funcionals anomenats sinapsis. La major part de les sinapsis són químiques i utilitzen els neurotransmissors per comunicar-se. La informació procedent de les cèl·lules adjacents activa les dendrites, i el soma la converteix en un senyal elèctric. En el moment en què els impulsos elèctrics superen el llindar d'excitació neuronal, es genera un potencial d'acció a la membrana que viatja a través de l'axó. Quan el potencial d'acció arriba al final de l'axó (botons sinàptics), promou l'alliberació dels neurotransmissors que difonen cap a la neurona veïna (post-sinàptica) on s'activen els receptors específics, capaços de rebre i integrar l'activitat elèctrica. Aquest senyal elèctric activarà de nou un altre potencial d'acció a la neurona veïna, el qual permetrà transmetre la informació a grans distàncies.

La beina de mielina ofereix una gran resistència i una baixa capacítància provocant que l'impuls produït en un nòdul de Ranvier, degut a la gran densitat de canals i transportadors iònics, salti al nòdul següent i així consecutivament, generant la conducció saltatòria. Si existeixen alteracions en la mielina, la conducció de l'impuls nerviós es veu alterada i pot provocar el deteriorament de les funcions motores, com passa en el cas de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica.

2. ASTRÒCITS I REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR

2.1. ASTRÒCITS

Els astròcits es van descriure simplement com "l'adhesiu" de les neurones en el cervell però, en els últims anys, s'ha descobert que tenen moltes i variades funcions. El seu paper és imprescindible pel correcte funcionament del sistema nerviós, ja que són les cèl·lules glials més abundants del SNC i constitueixen fins el 50% del volum total del cervell.

Els astròcits són cèl·lules estrellades amb prolongacions que es ramifiquen formant una xarxa en l'espai tridimensional. Els astròcits es poden dividir segons la forma d'aquestes prolongacions en (i) protoplasmàtics, que són els que es troben principalment a la substància grisa i presenten unes prolongacions molt ramificades al voltant de somes i dendrites neuronals, i (ii) en fibrosos, que es troben en la substància blanca i les seves prolongacions són llargues i primes contactant amb els vasos sanguinis (peus astrocitaris), constituint la unitat neurovascular del SNC.

Els astròcits estan polaritzats en dos dominis funcionals: (i) la part més extensa de membrana que està en contacte amb les sinapsis neuronals, i (ii) els peus terminals de les prolongacions que estan en contacte amb les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis. Estudis recents han definit que un sol astròcit està en contacte amb 4-8 somes neuronals i amb 300-600 dendrites procedents de diferents neurones (figura 5) (Benarroch, 2005).

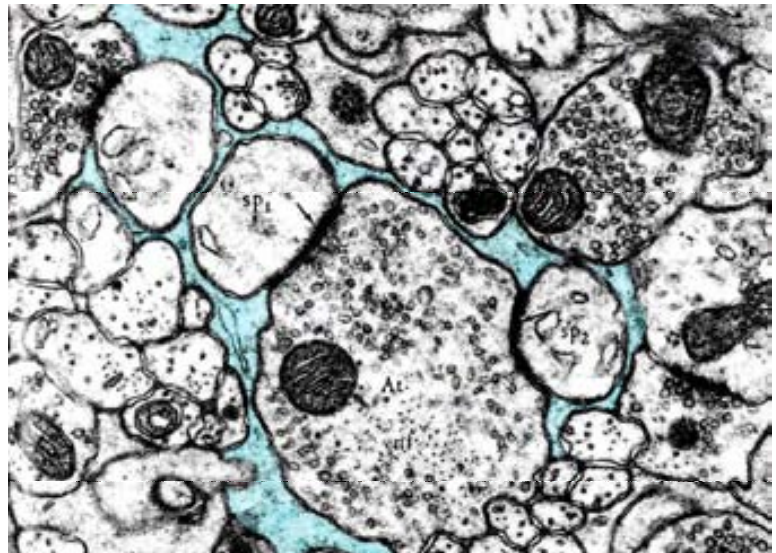


Figura 5. Micrografia electrònica on es mostra un astròcit (blau) en contacte amb terminals axonals (At) fent sinapsis asimètriques amb 4 espines (sp1, sp2, i dos no marcades) (Hatton, 2002).

Recentment, s'ha descrit una nova forma d'organització dels astròcits que s'ha denominat amb el concepte d'illa funcional de sinapsis. Aquests defineixen el seu propi territori, en el qual un astròcit s'encarrega de modular varies sinapsis, al voltant de 140,000 en el cervell murí i de 2 milions en un cervell humà (Halassa et al., 2007; Oberheim et al., 2008). Igual que les neurones, els astròcits tenen una plasticitat funcional i estructural que poden modelar i canviar en qüestió de minuts. Aquests canvis van des de la geometria cel·lular i les propietats de difusió, fins a la relació amb les neurones veïnes, especialment en les sinapsis (Theodosis et al., 2008). En cervells epilèptics, s'ha vist la pèrdua d'aquest domini organitzatiu dels astròcits. Els astròcits esdevenen reactius al voltant del nucli epilèptic provocant un augment del volum i en el nombre de processos, els quals

poden canviar la morfologia i solapar-se, provocant un increment de les espines dendrítiques en les neurones excitatòries (Oberheim et al., 2008).

A diferència dels oligodendròcits, els astròcits no tenen precursors descrits i encara no es coneixen els factors que indueixen la diferenciació cap a astròcits especialitzats (Blackburn et al., 2009).

2.2. PROTEÏNES DEL CITOESQUELET

El citoesquelet dels astròcits està format per microfilaments d'actina, microtubuls de tubulina i filaments intermedis (IF) tipus III constituïts per la proteïna acídica fibrillar glial (GFAP) i la vimentina (Medrano and Steward, 2001). La GFAP és la proteïna més important dels IF que formen el citoesquelet dels astròcits madurs, on la isoforma α és la més expressada. Mutacions en aquest gen causen la malaltia d'Alexander (Sawaishi, 2009). La GFAP també és necessària per la integritat de l'arquitectura de la substància blanca del SNC (Liedtke et al., 1996). En patologies com l'encefalopatia hepàtica, l'amoni redueix en un 80% l'expressió del mRNA de GFAP (Neary et al., 1994). La GFAP és el marcador més usat per identificar astròcits, encara que també s'expressa en endimòcits, glia radial, cèl·lules de Schwann no mielinitzants, cèl·lules progenitores neurals i cèl·lules olfactòries. S'han identificat altres marcadors d'astròcits, com S-100 β , la glutamat sintasa, el transportadors de glutamat/aspartat (GLAST o EAAT1), l'aquaporina-4 o l'aldehid deshidrogenasa 1 (Aldh1L1) (Cahoy et al., 2008). La localització d'algunes proteïnes de membrana depèn del citoesquelet d'actina, com l'aquaporina-4 (Nicchia et al., 2008). Els canvis de morfologia dels astròcits necessiten una reorganització del citoesquelet. La formació de processos astrocitaris requereix una desestructuració dels filaments d'actina, com passa en presència del dB-AMPC, un anàleg del AMPc (Baorto et al., 1992).

2.3. FUNCIONS DELS ASTRÒCITS

Els astròcits, juntament amb les neurones i els vasos sanguinis, constitueixen la unitat de control del correcte funcionament del cervell, regulant l'homeostasi del fluid extracel·lular, el metabolisme energètic i l'activitat sinàptica. Les funcions dels astròcits engloben un ampli ventall de processos, que van des de la regulació dels nivells de glutamat, la detoxificació d'amoni, la tamponació de la concentració extracel·lular de K^+ i la regulació del volum i el pH, fins a proveir les neurones del suport metabòlic i acoblar l'activitat sinàptica amb el rec sanguini local, protegir les neurones de l'estrès oxidatiu, i propagar i modular els senyals excitatòris en el cervell. Els astròcits tenen un paper dual en el cervell patològic, ja que actuen com a sistema de defensa, però al mateix temps, poden empitjorar el dany cerebral. Si es donen alteracions en alguna d'aquestes funcions, pot incrementar el mecanisme patofisiològic de moltes patologies neurològiques, com la isquèmia cerebral, la neurodegeneració, els atacs epilèptics, els edemes o l'encefalopatia hepàtica, entre d'altres.

A continuació es descriuen algunes d'aquestes funcions.

2.3.1. Els astròcits en el desenvolupament del SNC i en la formació de sinapsis

La interacció dels astròcits amb les neurones és important per al creixement dendrític, per a la formació de sinapsis efectives i per a la retirada de les sinapsis degenerades. Els astròcits secreten molècules que promouen o inhibeixen el creixement axonal, proporcionant una guia pel desenvolupament neuronal. També intervenen en el reemplaçament neuronal a partir de l'estoc de cèl·lules mare neurals (Blackburn et al., 2009; Hatton, 2002; Kanemaru et al., 2007).

2.3.2. Propagació del senyal excitatori glutamatèrgic i neuroprotecció

Els astròcits absorbeixen el glutamat, alliberat per les sinapsis neuronals, via transportadors d'aminoàcids (EAAT1 o GLAST i EAAT2 o GLT-1), protegint les neurones de l'efecte excitotòxic que provoca l'excessiva acumulació de glutamat en l'espai sinàptic. En els astròcits, el glutamat serveix tant de substrat metabòlic, com de precursor de glutamine i glutatió. Això permet mantenir l'estoc de glutamat de les neurones, ja que no poden sintetitzar glutamat a partir de glucosa, sinó a partir de glutamine. També serveix com a sistema detoxificador d'amoni, ja que el cervell no té cicle d'urea, sintetitzant la glutamina a partir del glutamat i d'amoni. El glutatió astrocític té un paper neuroprotector en l'estrès oxidatiu causat pel dany cerebral.

La propagació del senyal glutamatèrgic és possible ja que el glutamat alliberat causa una despolarització i un augment de Ca^{2+} en els astròcits, provocant un senyal que es propaga via les unions *gap* a través de la xarxa astrocitària. Les ones de Ca^{2+} provoquen l'alliberació d'ATP cap a l'espai extracel·lular, el qual actua per un mecanisme paracrí sobre el receptor purinèrgic P2Y₂, activant la producció de IP₃ i alliberant més Ca^{2+} . El senyal de Ca^{2+} allibera el glutamat dels astròcits via exocitosi (Rossi and Volterra, 2009). La sortida de glutamat citosòlic dels astròcits es fa a través de varis mecanismes que inclouen (i) la sortida de glutamat via exocitosi de vesícules dependent de Ca^{2+} , (ii) la sortida a través del transportador de glutamat dependent de Na^+ funcionant al revés (GLT-1), (iii) la sortida de glutamat via l'activació dels canals VSOACs (*volume-activated osmolites and anions channels*) en un context d'hiposmolaritat i resposta cel·lular reguladora de volum, (iv) la sortida per hemicanals funcionals, i (v) la sortida de glutamat via receptors purinèrgics que formen porcs permeables (Abbott et al., 2006; Blackburn et al., 2009; Iadecola, 2004; Iadecola and Nedergaard, 2007; Rossi and Volterra, 2009; Simard and Nedergaard, 2004).

2.3.3. Regulació del pH

Les neurones tenen el CO₂ com a producte final del metabolisme oxidatiu. Aquest és agafat pels astròcits i transformat en H⁺ i HCO₃⁻. Els H⁺ són expulsats de la cèl·lula juntament amb el lactat, provocant una basificació del medi intracel·lular i una acidificació de l'espai extracel·lular. Aquesta acidificació del medi disminueix l'activitat sinàptica, ja que els H⁺ redueixen l'activitat dels receptors de NMDA.

2.3.4. Tamponació del K^+

L'activitat sinàptica neuronal allibera K^+ al medi extracel·lular. El cervell està preparat per resistir concentracions de K^+ de 3 mM, però pot incrementar-se fins a 10-12 mM i en condicions patològiques, els nivells de K^+ poden arribar fins a 80 mM. La regulació de la concentració de K^+ és molt important, ja que aquest afecta a l'activitat neuronal, l'alliberació de NT, el metabolisme de la glucosa i el rec sanguini cerebral.

Hi ha 2 mecanismes de tamponació del K^+ en astròcits: (i) la tamponació espacial del K^+ que depèn de la xarxa d'astròcits. El K^+ és agafat per diversos canals (un dels més importants el canal de K^+ *inward rectifying*, Kir4.1) i transportat a través de la xarxa astrocitària, el qual és alliberat al torrent sanguini juntament amb aigua. (ii) L'adquisició de K^+ pels astròcits via Na^+, K^+ -ATPasa i el cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC). El NKCC s'activa en presència d'altres concentracions extracel·lulars de K^+ , important els ions Na^+ , K^+ i Cl^- cap a l'interior de la cèl·lula provocant l'inflament dels astròcits.

2.3.5. Suport metabòlic de les neurones

El suport metabòlic de les neurones és la glucosa. Els astròcits obtenen la glucosa a través de la barrera hematoencefàlica, gràcies al transportador GLUT-1 localitzat als peus astrocitaris en contacte amb els capil·lars, i és transportat a través de la xarxa astrocitària via unions *gap*. Els astròcits usen la glucosa per sintetitzar glicogen (suport neuronal en condicions d'hipoglicèmia) i àcid làctic, el qual és transportat cap a l'espai extracel·lular via transportadors monocarboxilat lligat a H^+ . Les neurones agafen el lactat i el converteixen en piruvat, substrat del metabolisme oxidatiu (Taberero et al., 2006).

2.3.6. Acoblament del metabolisme neuronal amb el rec sanguini

Les neurones, durant la sinapsi, alliberen vasodilatadors en una àrea restringida de 250 μ m. Aquest NT vasoactius són l' H^+ , el K^+ , l'adenosina, l'NO, l'àcid araquinoic o l'acetilcolina. Malgrat això, el control funcional del torrent sanguini el tenen els astròcits. Els astròcits poden secretar substàncies vasodilatadores (EET, adenosine, NO, metabòlits de COX-2) i substàncies vasoconstrictores (angiotensina, vasopressina, neuropeptid Y o endotelina). Els peus astrocítics estan en contacte amb els elements contràctils de les parets vasculares i són els responsables de transmetre el senyal de contracció o dilatació del vas sanguini (Jakovcevic and Harder, 2007).

2.4. PAPER DELS ASTRÒCITS EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES

El dany cerebral provoca una reacció específica en els astròcits anomenada astrogliosi reactiva. L'astrogliosi és una reacció defensiva que té com a objectiu limitar les àrees danyades del cervell, formant una cicatriu, i posteriorment a la lesió, ajudar a la remodelació dels circuits neuronals (Pekny and Nilsson, 2005). L'astrogliosi es caracteritza per una forta expressió de la GFAP, S-

100 β i la vimentina. Provoca un augment en les barreres hematoencefàlica degut a la hipertròfia dels processos astrocitaris i a la producció de components de la matriu extracel·lular, prevenint l'extensió de la lesió. Està descrit que al voltant de la lesió, hi ha dos tipus d'astròcits hipertròfics morfològicament diferents. Els astròcits proximals són asimètrics i els processos direccionats formen un patró radial al voltant de la lesió, mentre que a més distància, els astròcits tenen processos hipertròfics sense direcció (Chvatal et al., 2007).

Els desordres deguts a l'excitotoxicitat són causats per una excessiva despolarització de les neurones i una pèrdua de l'homeostasi iònica. Els astròcits contribueixen a l'excitotoxicitat, alliberant glutamat degut a l'acumulació de K^+ , Na^+ i Cl^- , fet que provoca que els astròcits s'inflin. Aquest astròcits inflats alliberen glutamat a l'espai extracel·lular via els canals aniònics regulats per volum, promovent l'estrès oxidatiu i provocant la mort neuronal en el teixit que els envolten. L'excitotoxicitat està implicada en els processos d'hipòxia, d'isquèmia, d'hipoglicèmia, de trauma, d'epilèpsia i d'encefalopatia hepàtica. També està implicada en patologies neurodegeneratives com l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) o l'Alzheimer.

L'edema cerebral està present en diversos desordres neurològics. S'han descrit 2 tipus d'edema: (i) l'edema vasogènic, que implica una ruptura en la barrera hematoencefàlica, provocant un increment en la permeabilitat i augmentant el volum de l'espai intersticial i dels peus astrocitaris. Aquest tipus d'edema es dona al voltant d'astrocitomes malignes on hi ha un augment de l'angiogènesi i de la permeabilitat vascular, en lesions desmielinitzants, com a conseqüència d'una isquèmia o trauma cerebral, o en l'encefalopatia hepàtica. (ii) L'edema citotòxic o osmòtic, el qual està provocat per un desequilibri osmòtic que promou l'entrada d'aigua a les cèl·lules. S'ha observat que no només els astròcits s'inflen, sinó que també ho fan les làmines de mielina i les dendrites neuronals, les quals causen efectes secundaris, com la despolarització de la membrana, l'entrada de Ca^{2+} als astròcits i l'alliberament de glutamat. (Benarroch, 2005; Maragakis and Rothstein, 2006).

Els danys en el cervell humà adult provoquen una forta resposta astroglítica, mentre que els danys en un cervell fetal o neonatal produeixen una resposta astroglítica mínima. En el cervell humà, comencen a haver-hi cèl·lules amb morfologia astrocitària al voltant de les 15 setmanes de gestació, encara que són astròcits immadurs que no esdevenen reactius. Aquests astròcits expressen nivells baixos de GFAP i tenen una baixa capacitat de resposta al dany cerebral. Entre les 20 i les 23 setmanes es poden observar astròcits reactius però són incapaços de respondre al dany i són més vulnerables a la hipòxia i a la isquèmia. Després de les 24 setmanes, els astròcits de la substància blanca lesionada són més abundants, expressen alts nivells de GFAP i presenten més processos ramificats. (Sen and Levison, 2006).

En el capítol 4 es fa una descripció més detallada de la implicació dels astròcits en les leucodistròfies, atès que aquest és l'objectiu d'estudi d'aquesta tesi.

2.5. REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR

Les cèl·lules animals tenen un volum específic definit i característic per a cada tipus cel·lular. El volum cel·lular pot ser modificat quan les condicions externes d'osmolaritat canvien o per qualsevol condició que variï la concentració intracel·lular d'osmòlits. La membrana cel·lular és molt permeable a l'aigua i, per això, qualsevol alteració en l'osmolaritat va seguida de fluxos d'aigua en la direcció necessària per restablir l'equilibri osmòtic, amb el subseqüent canvi de volum. En condicions fisiològiques, les cèl·lules de mamífers (amb alguna excepció) estan envoltades per fluids amb una osmolaritat molt ben regulada, però que es pot veure alterada en moltes condicions patològiques. L'increment del volum cel·lular és conseqüència de la reducció externa d'osmòlits (inflament hipoosmòtic) o deguda a canvis en la distribució intracel·lular d'osmòlits, en condicions d'osmolaritat externa constant (inflament isosmòtic). L'inflament isosmòtic es manifesta en les situacions de fallada energètica com la isquèmia i la hipòxia, o per encefalopatia hepàtica, trauma, etc. L'inflament també es dona en l'epilèpsia, quan existeix un mal funcionament neuronal i hi ha un alliberament excessiu de K^+ . El volum cel·lular també està compromès en condicions fisiològiques 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 glicolisi, la mobilitat o la secreció vesicular. La contracció cel·lular es dona en condicions d'osmolaritat externa elevada produïda per l'hipernatrèmia.

Moltes cèl·lules tenen l'habilitat de respondre a l'inflament hipoosmòtic per mecanismes de recuperació del volum, que aconseguen gràcies a la mobilització dels soluts acompanyats d'aigua. Els ions intracel·lulars més abundants (Cl^- i K^+), juntament amb les molècules orgàniques, són els osmòlits responsables del re-ajustament del volum, anomenat *regulatory volume decrease* (RVD). En canvi, el RVD en condicions d'inflament isosmòtic està menys investigat. La reducció del volum cel·lular com a conseqüència d'una hiperosmolaritat o d'unes condicions que provoquin un encongiment, també està regulat per l'acumulació de ions essencials (Na^+ i Cl^-) i d'osmòlits orgànics. El procés anomenat *regulatory volume increase* (RVI) està a càrrec dels cotransportadors de Na^+ , K^+ , Cl^- , i transportadors específics d'aminoàcids i polialcohols que actuen d'osmòlits (Kimmelberg, 2004a; Kimmelberg, 2004b; Kimmelberg et al., 2006; Lee et al., 2008; Pasantes-Morales and Morales Mulia, 2000; Pasantes-Morales et al., 2002).

Aquests mecanismes reguladors requereixen tres passos principals: (i) el mecanisme sensible a volum, per detectar canvis en el volum cel·lular i actuar de memòria de la forma i mida original; (ii) una cascada de transducció del senyal volumètric, connectant el sensor del senyal al mecanisme

de resposta; i (iii) l'activació dels mecanismes pel moviment d'osmòlits fins aconseguir l'equilibri osmòtic i la recuperació del volum cel·lular inicial (Lezama et al., 2005; Pasantes-Morales et al., 2000).

2.5.1. Regulació del volum en astròcits

En el cervell existeixen 4 tipus de compartiments que contenen fluids: (i) la sang en la vasculatura cerebral, (ii) el fluid cerebroespinal en el sistema ventricular i l'espai subaracnoid, (iii) el fluid intersticial en el parènquima cerebral, i (iv) el fluid intracel·lular que contenen les neurones i la glia. Aquests fluids tenen el seu propi volum i composició, i cada espai està separat dels altres per barreres que permeten el pas d'aigua i soluts de manera selectiva. Les alteracions en el volum cel·lular en el cervell poden tenir conseqüències dramàtiques. Els límits d'expansió imposats pel crani són mínims per amortiguar un augment del volum cerebral, fet que pot provocar una compressió dels vasos sanguinis i causar episodis d'hipòxia i isquèmia, compromentent la funció i supervivència neuronal. L'inflament és més predominant en astròcits que en neurones. Els astròcits, com la majoria de cèl·lules, són molt permeables a l'aigua i aquesta flueix a través de la membrana, dirigida pel gradient de pressió osmòtica, o afavorida bidireccionalment per la presència d'aquaporines (AQP4). En condicions hipoosmòtiques, la cèl·lula es comporta com un osmòmetre perfecte i la magnitud d'inflament d'aquesta és proporcional a la reducció osmòtica.

Sensor volumètric i osmotransducció

El primer pas de la regulació del volum, i el més important, és el sensor que activa els mecanismes de correcció del volum, encara que aquests no estan molt ben definits. Les candidates més prometedores són les proteïnes transmembrana, com ara les integrines, els receptors amb activitat tirosina quinasa (TKRs), els receptors acoblats a proteïna-G (GPCRs) i els canals receptors de potencial (TRPCs), tots ells activats per hipoosmolartiat. En la part intracel·lular, la dilució de macromolècules citosòliques o la disminució de la força iònica com a conseqüència de l'entrada d'aigua, són candidates per actuar com a senyals per detectar canvis en el volum. La reorganització del citoesquelet o els canvis en la concentració de molècules de senyalització, com el Ca^{2+} , també estan implicats en el mecanisme sensorial.

El receptors amb activitat tirosina quinasa, com per ex. l'EGFR, estan transactivats per les integrines. Aquesta activació es fa via les quinases d'adhesió focal (FAK), Src, o per receptors GPCR. El senyal convergeix en les vies de la MAPK, implicades en la reorganització del citoesquelet i la supervivència cel·lular, i la via antiapoptòtica formada per PI3K i Akt. La cascada de senyalització, activada per l'inflament hipoosmòtic, modula els fluxos de Cl^- i K^+ regulats per volum i la sortida d'osmòlits orgànics (figura 6) (Lezama et al., 2005; Pasantes-Morales et al., 2006; Vazquez-Juarez et al., 2008).

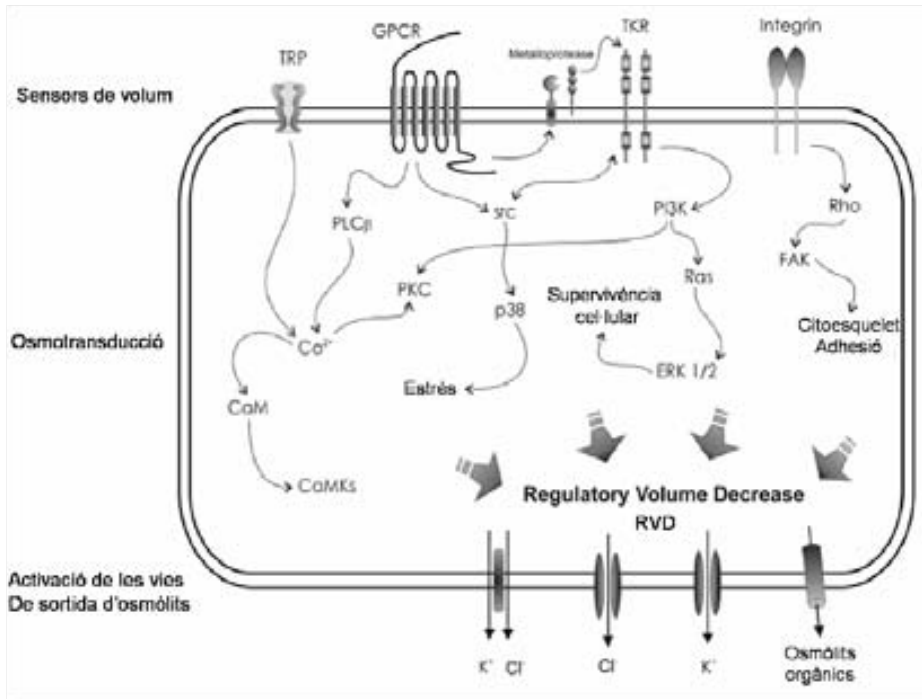


Figura 6. Model esquemàtic del mecanisme molecular involucrat en la resposta als canvis de volum. Els passos són: el sensor de volum, l'osmoltransducció del senyal i l'activació de la sortida d'osmòlits. A part del mecanisme de recuperació del volum, també s'activen respostes adaptatives de la cèl·lula als canvis de volum, les quals inclouen processos d'adhesió, remodelació del citoesquelet, mecanismes d'estrès, supervivència i protecció cel·lular (imatge modificada Vazquez-Juarez et al., 2008).

Vies de transport d'osmòlits

Els osmòlits implicats en la regulació del volum són tant ions inorgànics com petites molècules orgàniques, les quals inclouen sucres, aminoàcids, polialcohols i metilamines. L'expulsió o l'entrada d'ions són els mecanismes més ràpids per contrarrestar els canvis de volum. Els ions intracel·lulars més abundants són el Cl⁻ i el K⁺ i són els predominants en el RVD. S'han descrit uns tres tipus de canals de Cl⁻ regulats pel volum (VRACs): (i) els canals de Cl⁻ *outward rectifying* amb conductàncies de 40-100 pS (el mecanisme més utilitzat en la regulació del volum), (ii) els canals de Cl⁻ *inward rectifying* o *non-rectifying* amb conductàncies intermitges, i (iii) els canals de Cl⁻ *non-rectifying* amb conductàncies grans, de 100-400 pS. Tots ells estan modulats per l'activitat PKC i PKA. Els canals de K⁺ sensibles al volum tenen conductàncies de 20-30 pS i actuen de manera independent de Ca²⁺. La despolarització de la membrana és el primer efecte de l'inflament, produint una activació dels canals de K⁺ dependents de voltatge però independents de Ca⁺. Un dels canals implicats és el canal de K⁺ *voltage-gated* Kv1, però també s'han descrit canals de K⁺ controlats per hiposomolaritat o per inflament.

Durant el RVD, els osmòlits orgànics surten de la cèl·lula transportats sense despesa energètica. Els osmòlits orgànics més exportats són els aminoàcids excitatoris (EAAs) glutamat i aspartat, juntament amb taurina, via VRACs i receptors purínics (Kimelberg et al., 1990; Pasantes-Morales and Martin del Rio, 1990; Pasantes-Morales et al., 1990; Mulligan and MacVicar, 2006).

L'inflament dels astròcits, en condicions isosmòtiques, no està investigat en detall encara que és el més important, ja que es produeix tant en condicions fisiològiques com en condicions patològiques. Es creu que el mecanisme compensatori per restablir el volum inicial és un

mecanisme de correcció actiu. Aquesta correcció involucra la mobilització d'osmòlits però amb una major importància dels osmòlits orgànics, i la taurina en particular, ja que la mobilització del Cl^- i del K^+ requereix un canvi més gran el volum. Sembla que els VRACs tenen una activitat basal en els astròcits no inflats i poden estar modulats pel neurotransmissor ATP via el receptor P2Y. També intervé l'activació del cotransportador NKCC (Pasantes-Morales et al., 2000b).

La contracció dels astròcits en condicions d'hiperosmolaritat induïx el RVI, caracteritzat per una activació del canal NKCC que produeix una entrada de Na^+ , K^+ i Cl^- i d'aigua. També està involucrat el bescanviador Na^+/H^+ i el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, i la cèl·lula inhibeix els canals i els transportadors de sortida de K^+ i Cl^- (figura 7) (Jayakumar et al., 2008).

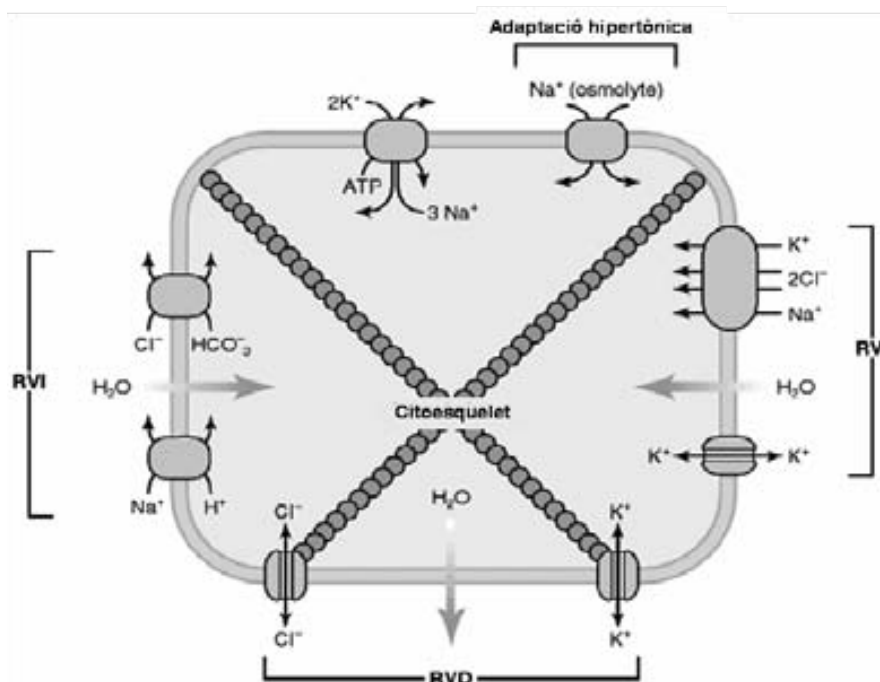


Figura 7. La resposta homeostàtica per mantenir el volum cel·lular està dirigida per canvis en l'activitat dels canals i dels transportadors iònics. La contracció cel·lular és contrarrestada pel RVI, activant el cotransportador NKCC1, el bescanviador Na^+/H^+ (NHE1) i el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ i mobilitzant els ions Na^+ , K^+ i Cl^- juntament amb l'aigua cap a l'interior de la cèl·lula, provocant un increment en el volum. L'inflament cel·lular és compensat pel RVD, que involucra l'activació del co-transportador KCC i els canals de Cl^- i K^+ activats per volum, fent sortir els ions, els osmòlits i l'aigua de la cèl·lula recuperant el volum inicial (Kahle et al., 2009).

Regulació hormonal de l'homeostasi iònica i de l'aigua en astròcits

Els neuropeptids vasopressina, atriopeptina, angiotensinogen i angiotensina II regulen l'entorn iònic i el volum cel·lular. La vasopressina provoca una entrada d'aigua a la cèl·lula a diferents nivells, activa els receptors AVP fent augmentar el Ca^{2+} , contribueix a l'acumulació del K^+ activant el transportador NKCC i modula l'activitat de l'AQP4. Per contra, l'atriopeptina disminueix l'entrada de Cl^- . L'angiotensinogen i l'angiotensina regulen la pressió sanguínia i activen la senyalització per Ca^{2+} (Simard and Nedergaard, 2004).

3. CITOESQUELET I TIPUS D'UNIONS CEL·LULARS

3.1. CITOESQUELET CEL·LULAR

El citoplasma de les cèl·lules està format per una xarxa de filaments que constitueixen el citoesquelet, el qual confereix a la cèl·lula la seva morfologia. El citoesquelet resisteix forces mecàniques externes de compressió i de tensió, i activa les cascades de senyalització corresponents als estímuls extracel·lulars mecànics i bioquímics. La dinàmica del citoesquelet permet a la cèl·lula la seva remodelació en situacions de desenvolupament, migració, resposta inflamatòria, invasió tumoral, xocs osmòtics, etc.

El citoesquelet està format per:

- Els microfilaments. Són filaments de 3-6 nm de diàmetre formats majoritàriament per actina (G-actina, monòmers globulars que polimeritzen formant la F-actin). Són responsables del moviment cel·lular, contracció i citoquinesis. Els filaments d'actina interaccionen amb proteïnes que els uneixen a les unions a membrana, com la vinculina (adhesions focals i unions adherents) i ZO-1 (unions *tight*), conferint a la cèl·lula resistència i morfologia.
- Els microtubuls. Són filaments cilíndrics de 20-25 nm de diàmetre compostos per protofilaments (polímers lineals) de tubulina. Formen un entramat implicat en el manteniment de la morfologia cel·lular i en cascades de senyalització. Degut a que els dímers de tubulina tenen uns cicles ràpids de polimerització/despolimerització, els microtubuls estan implicats en la migració de la membrana (unions focals, cilis i flagels) i en la divisió cel·lular. Tenen associades diverses proteïnes implicades en l'estabilitat (MAPs), o poden actuar com a transportador d'òrgans, vesícules, etc.
- Els filaments intermedis. Tenen un diàmetre de 10 nm i confereixen estabilitat a la cèl·lula, i connecten cèl·lules adjacents via desmosomes. Hi ha 5 tipus de filaments intermedis en funció del tipus cel·lular: tipus I (àcida) i II (bàsica): keratina (epiteli); tipus III: vimentina (fibroblast, endoteli i leucòcits), desmina (múscul), proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP, astròcits) i periferina (nervi perifèric); tipus IV: neurofilament; i tipus V: lamines (nuclears). Els IF estan associats a varies proteïnes que uneixen els filaments entre ells o amb altres estructures: plectina (amb microtubuls), ankyrina (amb actina), desmoplakina (amb desmosomes).

3.2. UNIONS CEL·LULARS

Les cèl·lules estan unides entre si o amb la matriu extracel·lular per diferents tipus d'unions. Per una banda, trobem les unions cèl·lula-cèl·lula, unions tipus *tight*, adherents, desmosomes i *gap* que proporcionen adhesió i comunicació entre elles. Per altra banda, l'adhesió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular mitjançant hemidesmosomes i adhesions focals (figura 8).

En aquest apartat de la introducció es fa un petit resum de cada una d'elles, juntament amb el complex distrofina-glicoproteïna.

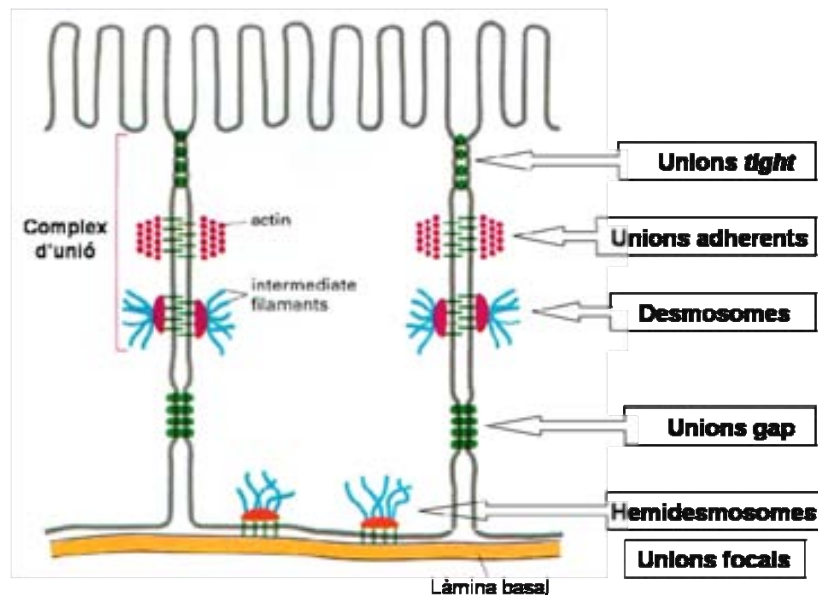


Figura 8. Representació dels diferents tipus d'unions en una cèl·lula epitelial (imatge modificada de <http://medinfo.ufl.edu/pa/chuck/summer/handouts/epi.htm>)

3.2.1. Unions gap

Les unions *gap* són canals intracel·lulars que permeten la difusió de petites molècules (fins a 1,5 kDa) com alguns metabòlits (glutamat, ATP), ions i missatgers secundaris (Ca^{2+} , IP_3), d'una cèl·lula a la cèl·lula veïna. Les unions *gap* en els vertebrats estan formades per connexines (s'ha descrit 20 membres diferents de la família, que s'anomenen pel seu pes molecular). Un grup de 6 connexines forma un connexó o hemicanal a la membrana cel·lular que pot interaccionar amb l'hemicanal de la cèl·lula adjacent per formar el canal intracel·lular *gap*. Aquests canals són presents en les cèl·lules vasculars, el múscul cardíac i llis, i les cèl·lules glials (Chanson et al., 2007), o localitzar-se a la superfície de la membrana plasmàtica formant un hemicanal obert a l'espai extracel·lular (Saez et al., 2003; Saez et al., 2005). La comunicació via *gap* pot ser inhibida per varies molècules, com l'octanol (Evans and Boitano, 2001).

Els astròcits presenten la xarxa de cèl·lules unides per unions *gap* més abundants en el CNS, anomenada comunicació glial per unions *gap*. Aquesta xarxa juga un paper molt important en la regulació de l'homeostasi, 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 (Taberner et al., 2006). Les connexines estan implicades en la propagació de les ones de Ca^{2+} intracel·lular a través de la xarxa astrocitària. A part de les 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). La connexina més abundant en els astròcits és la Cx43, seguida de la Cx30 i Cx26. S'ha vist que la Cx43 interacciona parcialment amb la proteïna *Zonula Occludens* (ZO-1) per establir la unió amb el citoesquelet d'actina. La presència de neurones fa augmentar l'expressió de la Cx43 i la comunicació entre astròcits (Rouach et al., 2000).

S'ha vist que les connexines interaccionen directa o indirectament amb altres canals i transportadors de membrana, com amb el CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), l'aquaporina-4, els receptors de glutamat ionotòpics i la pannexina 1 (Chanson et al., 2007). Patologies del CNS, com ara les malalties neurodegeneratives o les infeccioses, alliberen molècules inflammatòries com el TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 i l'NO, les quals modulen l'expressió de la Cx43 i alteren la comunicació a través de les unions *gap* (Kielian, 2008).

Estudis recents han identificat una nova família de proteïnes que formen hemicanals, anomenades pannexines (Px1 i Px2) (Shestopalov and Panchin, 2008). En oòcits de *Xenopus*, s'ha vist que són capaces de funcionar com canals tipus *gap* formant hemicanals funcionals (Barbe et al., 2006; Bruzzone et al., 2003; Iglesias et al., 2009). L'expressió d'aquestes proteïnes s'ha descrit a les neurones i s'ha suggerit que tenen un paper en la comunicació interneuronal en molts circuits neuronals (Vogt et al., 2005). En condicions de danys cerebral, on s'activa la glia reactiva, també es detecta transitòriament Px2 en astròcits (Zappala et al., 2007).

3.2.2. Unions *tight* i unions adherents

El complex d'unió apical de les cèl·lules endotelials és un conjunt multifuncional essencial per a la polarització cel·lular, la diferenciació i la fisiologia. Dues de les funcions més importants d'aquestes unions són (i) proporcionar una forta adhesió entre cèl·lules epitelials veïnes i (ii) controlar la difusió paracel·lular de les molècules des d'un cantó de l'epiteli a l'altre. Aquests complexos estan formats per unions adherents i tipus *tight* (Hartsock and Nelson, 2008; Tepass, 2003), importants en el CNS ja que formen les barreres neurovasculars.

3.2.2.1. Unions *tight*

Les unions *tight* (TJ) es caracteritzen microscòpicament per l'aproximació de la membrana plasmàtica de dues cèl·lules veïnes en l'espai intercel·lular, sense que hi hagi fusió d'aquesta. Encerclen el pol apical cel·lular formant la barrera física de difusió paracel·lular, i així prevenen la barreja de les proteïnes basolaterals amb les apicals, crucial pel manteniment de la polaritat cel·lular. Les TJ estan formades per proteïnes transmembrana, claudines i occludina (de la família de les tetraspanines) i JAM, que alhora atrauen altres proteïnes citoplasmàtiques d'ancoratge (ZO-1, 2 i 3), i de senyalització cel·lular (Rho GTPasa, PKC, PKA) (Brennan et al., 2010; Shin et al., 2006).

Les claudines són una família de 24 membres que interaccionen amb elles mateixes en *trans* formant la barrera física. Els canals que formen les TJ, s'han descrit com *paracellular tight junctions channels* (PTJC), funcionen com els canals iònics amb la selectivitat de la càrrega iònica, la permeabilitat dependent de la concentració d'ions i de la competició pel moviment de

molècules permeables (Tang et al., 2008; Tang and Goodenough, 2003). Això crea una resistència elèctrica transepitelial (TEER), utilitzada com a mesura de la permeabilitat paracel·lular.

L'occludina és una proteïna de 4 dominis transmembrana que quan està fosforilada es localitza a les TJ però en canvi, quan no està fosforilada, es troba a la membrana basolateral i a les vesícules citoplasmàtiques. L'occludina interacciona, via les proteïnes ZO, amb proteïnes JAM. El domini extracel·lular de l'occludina funciona com a localitzador de la proteïna a les TJ i també regula la permeabilitat paracel·lular de la barrera.

Les molècules d'unions adherents (JAM) són membres de la superfamília de les immunoglobulines (Ig) que s'expressen a l'epiteli, l'endoteli i a les cèl·lules hematopoiètiques. Són proteïnes d'un sol pas transmembrana amb dos motius *Ig-like* extracel·lulars que dimeritzen en *trans* formant les unions. A diferència de les claudines i de les occludines, les proteïnes JAM sembla ser que no participen en la regulació de la barrera paracel·lular (Mandell and Parkos, 2005).

Les proteïnes *Zonula Occludens* ZO-1, 2 i 3 són membres de la família de les guanilat quinases associades a membrana (MAGUK). ZO-1, 2 i 3 interaccionen entre elles i, alhora, amb la cingulina, la claudina 1-8, l'occludina, l'actina i l' α -catenina. S'expressen a les cèl·lules endotelials i epitelials, als fibroblasts, als astròcits i a les cèl·lules de Schwann (Gonzalez-Mariscal et al., 2000). En el CNS, les unions TJ contribueixen a la barrera neurovascular i a la barrera del fluid cerebrospinal. Està descrit que els processos astrocitaris que rodegen el vasos sanguinis indueixen la formació de la barrera hematoencefàlica (Vedula et al., 2005). En diversos estudis s'ha vist que, els astròcits en cultiu expressen occludina, ZO-1 i ZO-2, i claudina-1, aquesta última quan els astròcits humans s'exposen a IL-1 β (Bauer et al., 1999; Duffy et al., 2000; Howarth et al., 1992), formant estructures anomenades *TJ-like*. Aquestes estructures no són capaces de formar una barrera *per se*, suggerint que en astròcits, les TJ formen un tipus d'unió diferent a la que formen les cèl·lules epitelials i endotelials. També s'ha descrit l'expressió de claudin-11 en cèl·lules neuronals, fet que suggereix la presència de TJs a la mielina (Wachtel et al., 2001).

Nombroses malalties humanes estan associades a les proteïnes de TJ. En el SNC, les malalties són neurodegeneratives, autoimmunes i infeccioses, com l'esclerosi múltiple (on hi ha una disminució de l'expressió de l'occludina i la VE-cadherina (Plumb et al., 2002)), l'Alzheimer (Fiala et al., 2002), la distròfia muscular de Duchene (Nico et al., 2003), la hipòxia (Fischer et al., 2002), etc.

3.2.2.2. Unions adherents

En les cèl·lules epitelials, les unions adherents són les responsables de l'estabilització i de la unió forta entre cèl·lules, de la regulació del citoesquelet d'actina, de la senyalització intracel·lular i de la

regulació transcripcional. Les caderines són proteïnes d'un sol pas transmembrana (família de proteïnes d'adhesió dependents de Ca^{2+}) i presenten 5 dominis repetits extracel·lulars que permeten la interacció en *trans* entre elles, unint Ca^{2+} per la correcta organització conformacional dels dominis. El domini intracel·lular interacciona amb proteïnes de reciclatge i de degradació, de senyalització i de control del citoesquelet d'actina. Les caderines interaccionen amb la família de les catenines citoplasmàtiques (subunitats α , β i p-120), que alhora interaccionen amb el citoesquelet d'actina mitjançant la vinculina i ZO-1, entre d'altres (Boda-Heggemann et al., 2009; Hartsock and Nelson, 2008). La β -catenina citosòlica pot actuar com a un factor de transcripció de gens associats a la proliferació cel·lular, cascada activada pel factor extern Wnt, quan es troba fosforilada a la Y142 (Brembeck et al., 2006; Nelson and Nusse, 2004).

Està àmpliament descrit a la literatura, la presència de caderines i catenines en astròcits. La N-cadherina s'expressa a neurones perifèriques i a cèl·lules glijals, i està implicada en varis processos, incloent-hi l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, la diferenciació, l'embriogènesi i la plasticitat sinàptica (Derycke and Bracke, 2004; Okamura et al., 2004; Tran et al., 2008). També està descrita l'expressió de VE-cadherin, α -catenina, ZO-1, cingulina, afadina i caderina-11 en astròcits (Boda-Heggemann et al., 2009).

3.2.3. Unions focals

L'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular es dona majoritàriament per la interacció de les proteïnes transmembranes (les integrines) a la matriu. Com a resultat d'aquesta interacció, s'activa una resposta intracel·lular que provoca una reorganització del citoesquelet d'actina (requisit pel canvi de forma cel·lular i mobilitat) i canvis en l'expressió gènica.

La paxillina és una proteïna adaptadora d'adhesions focals que uneix indirectament les integrines a diverses proteïnes, per tal d'activar les vies de senyalització corresponents. L'activació de les diverses vies es produeix en funció de si la cèl·lula respon a factors de creixement, o de si respon a la interacció de les integrines amb la matriu extracel·lular (Campbell, 2008; Turner, 2000a; Turner, 2000b).

Thy1 és una proteïna de la superfamília de les IgGs expressada en neurones que interacciona amb la β_3 -integrina i indueix la formació d'unions focals en astròcits (Hermosilla et al., 2008).

3.2.4. Desmosomes i hemidesmosomes

Els desmosomes, també coneguts com a *maculae adherents*, són estructures d'adhesió cèl·lula-cèl·lula localitzats a les membranes laterals. Ancoren fortament els filaments intermedis de les cèl·lules a la membrana, i a la vegada, s'adhereixen a la cèl·lula adjacent, aportant una resistència que permet a la cèl·lula resistir forces mecàniques. L'espai extracel·lular entre les dues parts del

desmosoma s'anomena *Desmoglea* i està format pels dominis extracel·lulars de les caderines desmosomals amb un sol pas transmembrana (desmogleina i desmocollina). En el citoplasma, hi ha 2 estructures denses formades per la desmoplakina, les quals s'uneixen a les caderines via la plakoglobina i la plakofilina, i als filaments intermedis (Alberts, 2002).

Els hemidesmosomes són estructures petites asimètriques situades a la superfície basal interna dels keratinòcits a l'epidermis. Són similars als desmosomes, però els hemidesmosomes ancoren els filaments intermedis a la matriu extracel·lular, usant integrines com a proteïnes d'adhesió. Els hemidesmosomes estan format per plaques en forma de rivet (interna i externa), les quals estan constituïdes per la plectina citosòlica que uneix els filaments intermedis a la integrina $\alpha 6 \beta 4$. La integrina s'adhereix a les proteïnes d'adhesió de la matriu extracel·lular, com la laminina, formant una forta interacció (Kowalczyk et al., 1996; Nguyen et al., 2006).

3.2.5. Processos astrocitaris perifèrics

Els astròcits desenvolupen processos lamelars fins (50-100 nm), majoritàriament al voltant de les sinapsis, modulant la funció sinàptica o la interacció astròcit-neurona. En aquest tipus de processos intervenen les proteïnes ERM (Ezrina, Radixina i meosina), que uneixen la membrana de la filopòdia al citoesquelet d'actina (Derouiche and Frotscher, 2001).

3.3. COMPLEX DISTROFINA-GLICOPROTEÏNA (DGC)

El complex glicoproteïna associada a la distrofina es va descriure designant els components com a proteïnes associades a distrofina (DAPs) i glicoproteïnes associades a distrofina (DAGs). Posteriorment, les proteïnes del complex es van dividir en dos sub-complexes: els complexos distroglicà i el sarcoglicà (Yoshida et al., 1994). Els components del DGC inclouen diverses proteïnes citoplasmàtiques, com la distrofina, la sintrofina i la distrobrevina; i dos complexos de membrana (distroglicà i sarcoglicà) (figura 9).

El DGC forma la unió entre el citoesquelet de la cèl·lula i la matriu extracel·lular. En múscul, uneix el citoesquelet de les fibres musculars a la matriu extracel·lular, mantenint la integritat estructural de les fibres durant les repeticions de contracció i dilatació, protegint la membrana muscular (sarcolema) del dany mecànic. El DGC també està implicat en la regulació de l'homeostasi del calci.

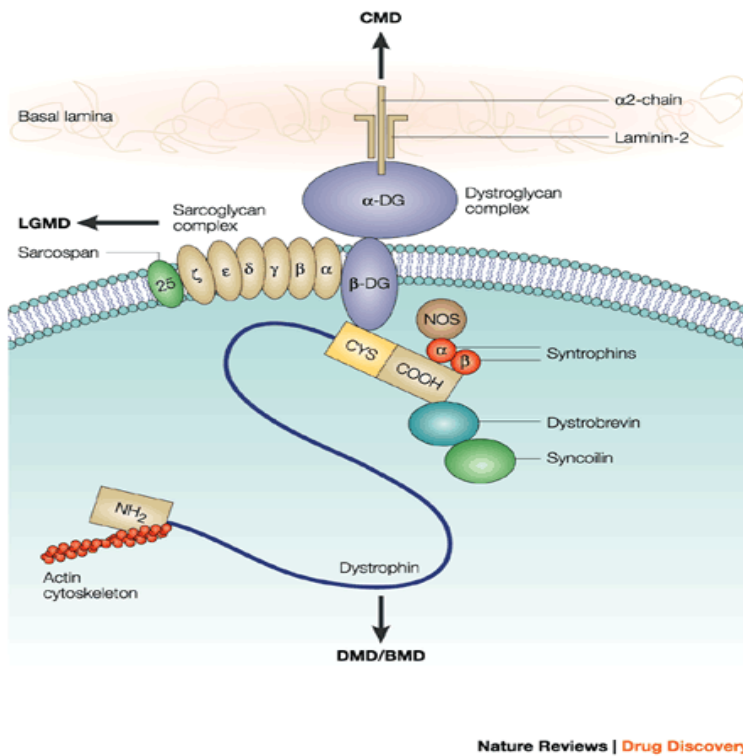


Figura 9. Representació esquemàtica del DGC on es mostren els diferents components del complex i la unió amb la matriu extracel·lular i el citoesquelet de la cèl·lula.

La composició proteica del DGC difereix en funció del teixit on es troba. La descripció següent dels components del DGC és general, i bàsicament són proteïnes presents en teixit muscular i cerebral.

1. Complex glicoproteïna de membrana:

1A. Complex distroglicà: està format per α-distroglicà, que s'uneix a laminina-2 i agrin en múscul i glia, i a neurexin en neurones; i el β-distroglicà.

1B. Complex sarcoglicà (SGC): interacciona lateralment amb el complex distroglicà, els components són tots glicoproteïnes transmembrana i està format per les subunitats α, β, γ, δ, ε i ζ-sarcoglicà.

2. Complexes citoplasmàtics:

2A. Complex sintrofina: format per α-sintrofina (proteïna àcida de múscul), β1-sintrofina (proteïna bàsica obiqua), β2-sintrofina (proteïna bàsica d'unió neuromuscular), γ1- i γ2-sintrofina.

2B. Distrobrevina: està composta per α-distrobrevina (teixit muscular) i β-distrobrevina (teixit cerebral), ambdues són membres de la família de la distrofina.

3. Components addicionals: altres proteïnes associades al DGC són la distrofina, l'utrofina, el sarcospan i l'actina-associada a citoesquelet. També estan associades al complex, però són menys importants, la caveolina-3 i la sintasa neuronal d'òxid nítric (nNOS) (veure pàgina web: www.dmd.nl).

Les proteïnes distrofina, sintrofina i els distroglicans estan molt expressades a astròcits perivasculars i interaccionen amb diversos canals i receptors. En aquestes cèl·lules, s'ha descrit que el DGC forma part d'un complex que regula el transport d'aigua intracel·lular, ja que la sintrofina interacciona amb el canal d'aigua AQP-4 i el canal de potassi Kir4.1 en els processos astrocitaris en contacte amb els vasos. A neurones, la distrofina interacciona amb el receptor GABA_A i intervé en la inhibició sinàptica GABAèrgica.

Les malalties associades al DGC són distròfies musculars (DM), com la distròfia muscular de Duchenne i la de Becker, on hi ha una manca o una reducció de la distrofina i consegüentment, una expressió anormal de sintrofina i distrobrevina. Les sarcoglicanopaties són DM hereditàries. Entre elles trobem la DMD-*like*, la distròfia muscular severa d'infància, la forma tardana de la DM de Limb-Girdle i el síndrome de distònia mioclònica. Totes elles estan causades per mutacions en les diferents subunitats del complex sarcoglicà. En els últims anys, s'han descrit altres DM congènites (DMC) rares, relacionades amb defectes en la glicosilació del α -distroglicà, com la DMC de Fukuyama, la malaltia múscul-ull-cervell, una malaltia fenotípicament semblant al síndrome de Walker-Warburg, la DM Limb-Girdle en resposta a esteroides i la cardiopatia dilatada amb feblesa muscular (Waite et al., 2009; Blake, 2002).

En aquest treball es parlarà del DGC, ja que la distròfia muscular congènita tipus 1A presenta anomalies en la substància blanca detectades per ressonància magnètica d'imatge, i es caracteritza per vacuoles en la mielina a nivell histopatològic. Presenta un fenotip similar al fenotip de la leucoencefalopatia megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC). Alguns grups han descrit l'associació de la proteïna MLC1, proteïna d'estudi del nostre grup, amb el DGC.

4. LEUCODISTRÒFIES

La paraula leucodistròfia prové de les arrels gregues “*leuco*” (blanc), “*dis*” (discapacitat) i “*trophos*” (creixement); per tant, les leucodistròfies agrupen un conjunt de trastorns del sistema nerviós on la generació, el desenvolupament i/o el manteniment de la mielina es veuen afectats. Engloba aquelles malalties d'origen genètic que afecten a la mielina, i exclou malalties de tipus inflamatori o autoimmune, i d'origen ambiental. Les leucodistròfies que impliquen el SNC es denominen leucoencefalopaties.

Existeixen nombrosos gens implicats en el manteniment i el funcionament de la mielina, i les mutacions en aquests gens poden provocar les diferents patologies. També inclouen mutacions de gens no relacionats amb la mielina, però que l'afecten de manera indirecta. Els defectes d'aquests gens poden ser hereditats de forma dominant, recessiva o lligada al cromosoma X.

4.1. CLASSIFICACIÓ DE LES LEUCOENCEFALOPATIES

La classificació patològica agrupa les malalties de la substància blanca segons criteris fenotípics corresponents als defectes que provoquen en la síntesi o en el manteniment de la mielina.

- Desmielinitzants, aquelles que provoquen una degradació de la mielina per un defecte en la seva estructura, generalment per l'acumulació de compostos lipídics que resulten tòxics pels oligodendròcits. Per exemple: Adrenoleucodistròfia, Malaltia de Krabe o la Leucodistròfia Metacromàtica.

- Hipomielinitzants, aquelles provocades per una producció baixa de mielina degut a una disfunció proteica que provoca una mala compactació de la mielina. Per ex.: Pelizaeus-Merzbacher, Alexander, *Vanishing white matter* (VWM) o deficiència en MBP.

- Espongiformes, aquelles caracteritzades per una degeneració quística de la mielina ja que estan afectades, principalment, les vies implicades en el control del volum cel·lular. Per exemple: la malaltia de Canavan o la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC).

La classificació bioquímica agrupa les leucoencefalopaties en funció dels defectes que provoquen les mutacions en els diferents gens.

- Trastorns lipídics: Adrenoleucodistrofia, Malaltia de Krabe, Leucodistròfia Metacromàtica, Síndrome Sjögren-Larsson o Xantomatosi cerebrotendinosa.

- Trastorns de les proteïnes de la mielina: Pelizaeus-Merzbacher, deficiència en MBP.

- Trastorns relacionats amb àcids orgànics: Canavan.

- Trastorns en el metabolisme energètic: MELAS, Leber, Complex I i III, Citocrom oxidasa.

- Altres causes: CADASIL, deficiència en la merosina.

- Causes desconegudes: Alexander, *Vanishing white matter*, MLC i Aicardi-Goutieres.

La mielinització es produeix durant els primers dos anys de vida però el procés no és completat fins a l'adolescència. Per aquest motiu, les leucodistròfies apareixen majoritàriament en la infantesa. La formació de la mielina i el seu manteniment requereix el funcionament conjunt dels oligodendròcits, els astròcits i les neurones. Els astròcits s'han relacionat amb el manteniment de la substància blanca (Liedtke et al., 1996) i juguen un paper important en les malalties hereditàries de la substància blanca, com la leucoencefalopatia *Vanishing white matter*, la malaltia d'Alexander (Sen and Levison, 2006) i MLC. Per aquest motiu, s'explica a continuació les leucodistròfies en les quals s'hi ha descrit una disfunció en els astròcits.

4.2. LEUCODISTRÒDIES AMB DISFUNCió ASTROCITÀRIA

4.2.1. Vanishing White Matter (VWM)

Vanishing white matter és una leucoencefalopatia autosòmica recessiva que majoritàriament es manifesta a la infància. Es coneix amb altres noms com ara l'ataxia infantil amb hipomielinització (CACH). Els símptomes que caracteritzen aquesta leucodistròfia són:

- Desenvolupament mental i motor inicialment normal.
- Deteriorament neurològic seguit de trauma cerebral i infeccions febrils acabats en coma.
- Atàxia cerebral progressiva i espasticitat amb episodis d'epilèpsia.
- Atròfia òptica però no en tots els pacients.

La ressonància magnètica d'imatge (MRI) mostra la substància blanca anormalment difusa, que amb el temps desapareix i és reemplaçada per fluids; en canvi, la substància gris no es veu afectada. L'autòpsia d'un cervell afectat de VWM revela una substància blanca tova, gelatinosa i descolorida principalment en les àrees frontal i parietal. La pèrdua de mielina va associada a una pèrdua axonal, a la formació d'astroglíosis i a la hiperplàsia astrocitària amb processos atrofiats. La resposta dels oligodendròcits és més variable. En algun casos, s'observa un augment en el número d'aquests, i en d'altres una reducció, però amb una morfologia anormal presentant un increment del volum citoplasmàtic envoltat per estructures membranoses (Pronk et al., 2006; van der Knaap et al., 2006a).

La malaltia de VWM està associada a les mutacions de les 5 subunitats del factor d'iniciació de la traducció eucariota 2B (*eIF2B*), proteïnes essencials per a la correcta síntesi proteica. Les mutacions en aquest factor afecten a la síntesi de proteïnes relacionades amb la mielina (Pan et al., 2009; Scheper et al., 2006). La glia distròfica s'ha associat a l'activació de la resposta de proteïnes mal plegades (UPR), la qual inhibeix la síntesi de noves proteïnes i produeix senyals pro-sobrevivència i pro-apoptòtiques (van der Voorn et al., 2005; van Kollenburg et al., 2006). Les mutacions en *eIF2B5* provoquen una disminució dels astròcits GFAP positius i comprometen el desenvolupament dels progenitors (Dietrich et al., 2005).

4.2.2 Alexander

La malaltia d'Alexander és una malaltia neurològica rara, progressiva, sense teràpia específica. Depenent de l'edat d'inici, les característiques clíniques i histopatològiques difereixen. La forma infantil té una supervivència curta i es caracteritza per:

- Retard psicomotor progressiu i pèrdua del desenvolupament de les conductes.
- Megalencefàlia, atàxia, hiperreflexia i senyals piramidals.
- Atacs epilèptics.

La forma juvenil és més progressiva i es caracteritza per un o més d'aquests símptomes:

- Anormalitats en la parla i en empassar, vòmits freqüents.
- Espasticitat i atàxia, deteriorament intel·lectual i cognitiu.
- Episòdis epilèptics i problemes per respirar.

La forma adulta és molt poc comuna i els símptomes són variables, ja que poden presentar un o més senyals:

- signes bulbars o pseudobulbars, piramidals, cerebelars, disautonomia, alteracions en el son, paràlisi o paraplègia, etc.

El diagnòstic es fa per MRI, on s'observen anomalies simètriques en la substància blanca, en els gànghlis basals i en el tàlam. Aquestes anomalies inclouen l'atròfia i l'inflament de la substància blanca, anormalitats en la medul·la i el cervell mig. L'autòpsia d'un cervell d'un pacient d'Alexander va revelar una substància blanca reduïda amb una destrucció d'aquesta i un major pes del cervell (Gorospe and Maletkovic, 2006; Mignot et al., 2004; Sawaishi, 2009; Takanashi et al., 1998; van der Knaap et al., 2006b). El principal causant de la malaltia són les fibres de Rosenthal presents en els astròcits hipertròfics, les quals s'acumulen en els processos astrocitaris. Les fibres estan formades per la GFAP mutada, hsp27, ubiquitina i $\alpha\beta$ -cristallin, i són més presents en àrees on hi ha desmielinització. Els oligodendròcits no presenten alteracions cel·lulars mentre que les neurones disminueixen en nombre i, en les àrees desmielinitzades, els axons poden estar preservats o afectats.

La malaltia està provocada per mutacions en el gen *GFAP*. Actualment, s'han descrit més de 49 mutacions. Les mutacions causen la desorganització dels filaments intermedis dels astròcits amb la formació d'agregats tòxics. La sobreexpressió de GFAP també provoca la malaltia (Cho and Messing, 2009; Hagemann et al., 2006; Hagemann et al., 2006; Hsiao et al., 2005)

5. LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFÀLICA AMB QUISTS SUBCORTICALS (MLC)

L'any 1991, un neuròleg de Bombay va presentar les característiques clíniques d'un grup de pacients locals, tots pertanyents al nord de la Índia, anomenats Agarwals (Singhal et al., 1991). Aquests pacients mostraven signes de macrocefàlia, un lleuger retràs mental i espasticitat progressiva. No es van trobar anomalies metabòliques però els estudis de neuroimatge mostraven la substància blanca difusa i la presència de quists a nivell subcortical. Degut a la homogeneïtat de fenotips dins el grup, es va proposar que la malaltia es transmetia per herència autosòmica recessiva.

L'any 1995, la Dra. Marjo van der Knaap va publicar una sèrie de característiques clíniques específiques de la malaltia que van permetre la seva identificació i diagnosi (van der Knaap et al., 1995a; van der Knaap et al., 1995b). Posteriorment, altres autors van anar aportant dades noves sobre aquest trastorn (Biancheri et al., 2000; Goutieres et al., 1996; Gulati et al., 2000; Koeda and Takeshita, 1998; Mejaski-Bosnjak and Besenski, 1997; Mejaski-Bosnjak et al., 1997; Singhal et al., 1996; Takanashi et al., 1998; Thelle et al., 1999; Topcu et al., 1998; Yakinci et al., 1999). Aquesta malaltia ha rebut diferents noms, com "*leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild course*", "*infantile leukoencephalopathy and megalencephaly*", "*vacuolating leukoencephalopathy*" and "*van der knaap syndrome*", però la major part dels investigadors implicats en el camp han consensuat la denominació ***megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC)***.

5.1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DE LA MALALTIA

S'ha proposat un quadre clínic característic pels pacients de MLC, basat en aspectes clínics i en dades obtingudes de l'anàlisi per neuroimatge (MRI), degut a la falta de marcadors bioquímics (Singhal et al., 1996; Topcu et al., 1998; van der Knaap et al., 1996). La identificació de la malaltia es basa en les següents característiques:

- 1- Macrocefalia al primer any de vida. Després del primer any, el creixement del cap resulta generalment normal, arribant a una línia paral·lela al percentil 98.
- 2- Desenvolupament inicial del pacient, a nivell cognitiu i motor, generalment sense incidències. Durant els primers anys de vida, els pacients mostren autonomia per caminar.
- 3- Deteriorament de les funcions motores i ataxia cerebelar juntament amb espasticitat durant la infància més tardana i l'adolescència. La capacitat per caminar és limitada i inestable i la majoria dels pacients acaben necessitant cadira de rodes. El to muscular tendeix a ser escàs i els reflexes dels tendons extensors són massa bruscs.
- 4- Dificultats de tipus disartrític en el llenguatge, podent desenvolupar disfàgia.
- 5- Defectes en el moviment extrapiramidal, incloent distònia i atenosi en períodes més tardans.

- 6- Lleuger retard mental tardà.
- 7- La majoria de pacients presenten episodis epilèptics controlats amb relativa facilitat (Yalcinkaya et al., 2003).
- 8- Un trauma craneoencefàlic pot augmentar la severitat del deteriorament motor i dels atacs epilèptics, i pot provocar períodes d'inconsciència prolongada que poden desencadenar en un estat de coma (Bugiani et al., 2003).

Encara que la malaltia de MLC presenta un patró fenotípic característic, existeix una gran variabilitat en les manifestacions clíniques entre els diferents pacients, fins i tot entre els membres d'una mateixa família. També varia l'esperança de vida, mentre que uns pacients moren a l'adolescència, d'altres arriben als 40 anys. Aquesta heterogeneïtat indica que existeixen factors genètics i/o ambientals que influeixen en la severitat de la malaltia (Blattner et al., 2003).

Els estudis de neuroimatge, realitzats mitjançant tècniques de ressonància magnètica d'imatge (MRI), presenten un patró característic pels pacients de MLC que els diferencia de les altres leucodistròfies. Els criteris basats en MRI són:

- 1- Encèfal atrofiat i inflat que mostra una substància blanca anormalment difusa (figura 10, A) comparat amb un encèfal d'un nen que no presenta la malaltia (figura 10, B).
- 2- A les estructures centrals com el cos callós, la càpsula interna i el tronc cerebral, la substància blanca es troba més conservada encara que la seva integritat no sol ser total.
- 3- La substància blanca del cerebel presenta un senyal lleugerament anormal però amb un volum similar.
- 4- Presència de quists subcorticals a la regió anterior-temporal i fronto-parietal (figura 10A, fletxes).
- 5- Al llarg del desenvolupament de la malaltia, el volum desmesurat de la substància blanca disminueix però l'atròfia cerebral continua i, normalment, el número i la mida dels quists augmenta amb el temps.

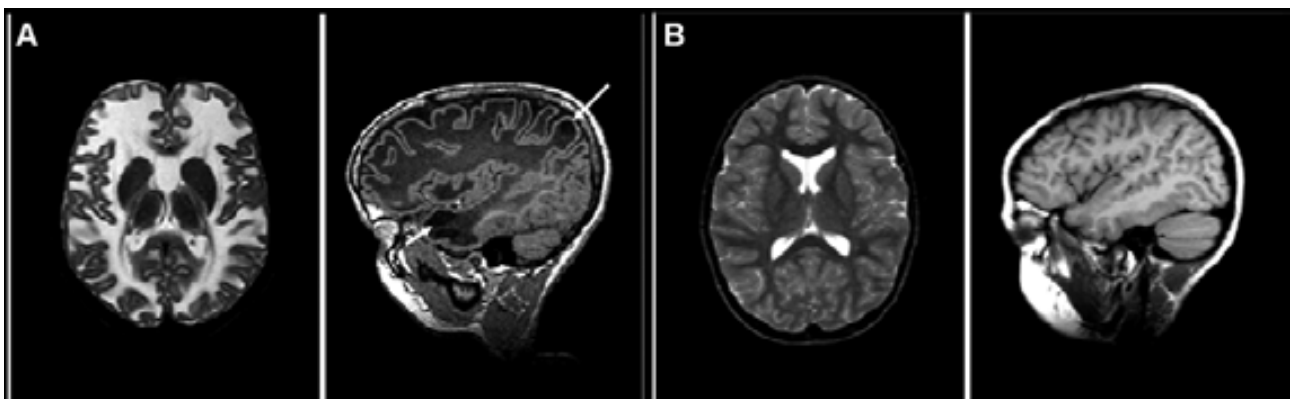


Figura 10. Imatges de MRI corresponents a un pacient de MLC (A) i un control (B). (A) MRI d'un pacient de MLC on s'observa la substància blanca anormalment difusa i la presència de quists subcorticals (fletxes). (B) MRI d'un pacient control no afectat. Esquerra, vistes axials; dreta, vistes sagitals.

Existeix però, un petit percentatge dels pacients que presenten unes característiques fenotípiques diferents. Tot i presentant un quadre clínic de MLC als primers anys de vida, no s'han trobat mutacions en el gen *MLC1*, les funcions motores són normals i presenten un baix grau d'hipotònia. La substància blanca recupera la seva mida i els quists subcorticals desapareixen, això suggereix que existeixen dos fenotips genèticament diferents. Els pacients es classifiquen segons tinguin un fenotip "clàssic" (si compleix totes les característiques clíniques) o un fenotip "benigne" (si presenten les millores) (van der Knaap, no publicat).

Mitjançant l'anàlisi amb tècniques d'espectroscòpia per ressonància magnètica de protons, es va observar una reducció de la majoria de metabòlits, com l'*N*-acetilaspargat, la creatina i la colina (Brockmann et al., 2003; De Stefano et al., 2001; van der Knaap et al., 1995), compatible amb una dilució d'aquests. També s'ha publicat que existeix un augment en la glicina i en la taurina en alguns pacients (Sener, 2003a; Sener, 2003b).

Un estudi utilitzant *in vivo* SPECT (*single photon emission computed tomography*) d'un pacient de MLC va revelar anomalies a l'escorça frontal que no s'observaven per MRI, concretament en el funcionament de les neurones corticals (Kiryama et al., 2007).

Des del punt de vista fisiopatològic, l'estudi d'una biòpsia obtinguda d'un pacient de MLC mostrava un fenotip de degeneració esponjiforme de la substància blanca (van der Knaap et al., 1996). La biòpsia va revelar la presència de nombroses vacuoles situades a les lamines més externes de la mielina (figura 11). La majoria de vacuoles es troben envoltades per una única membrana de mielina, encara que algunes es troben rodejades per estructures multilaminars de mielina o propagacions cel·lulars corresponents a oligodendròcits. El fet que les vacuoles només es formen a la part més externa de la mielina fa pensar que no compromet en excés la transmissió de l'impuls nerviós, fet que podria explicar que el fenotip clínic de la malaltia sigui progressiu i normal durant els primers anys de vida.

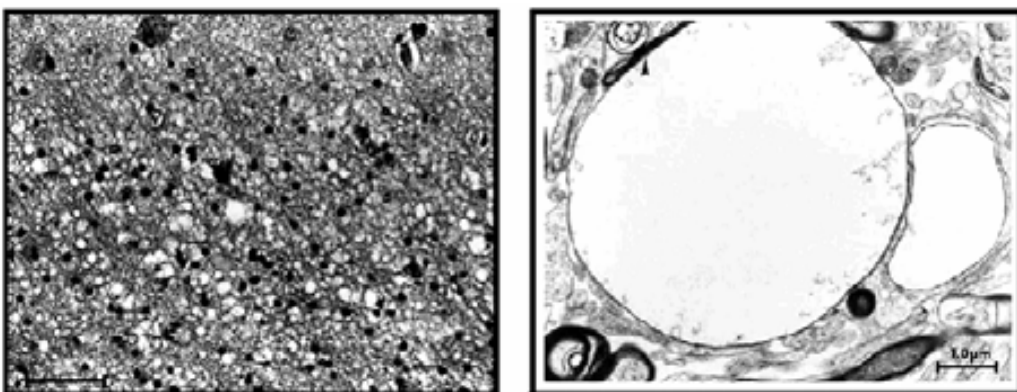


Figura 11. Microfotografies d'un pacient de MLC que mostren la presència de vacuoles en la substància blanca subcortical mentre que la neocorça no està afectada (esquerra, a dalt). A la dreta, per microscopia electrònica s'observa una gran vacuola en la lamina es externa de la mielina (van der Knaap et al., 1996).

5.2. EL GEN *MLC1*

Estudis familiars de varis grups ètnics turcs van suggerir que *MLC* té un patró d'herència autosòmica recessiva. Després d'un exhaustiu anàlisi de gens candidats a la malaltia i realitzant estudis de lligament, es va mapar el locus per *MLC* una regió de 2 Mb del cromosoma 22qtel (Topcu et al., 2000).

Estudis posteriors d'un grup heterogeni de famílies de *MLC*, van revelar mutacions en un gen denominat *MLC1* (*KIAA0027*, MIM 604004), el primer gen responsable de la malaltia (Leegwater et al., 2001). Encara que, un 20% dels pacients amb el quadre clínic de *MLC* no presenten mutacions en aquest gen, ni tant sols lligament amb el locus. Aquest fet suggereix que existeixen dos o més gens implicats en la malaltia (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003).

El gen *MLC1* comprèn una regió de 26,2 kb i està format per 12 exons, el primer dels quals no és codificant, amb un mRNA resultant de 3435 pb. S'han descrit 2 transcrits que difereixen en l'exó 1 però que resulten en el mateix mRNA.

5.2.1. Mutacions identificades en el gen *MLC1*

Fins el moment, s'han descrit 63 mutacions diferents en el gen *MLC1* (Taula 1). Els diferents tipus de mutacions trobades són: missense en un 44,5%, delecions i insercions amb canvi de pauta de lectura en un 30%, d'*splicing* un 19%, *nonsense* un 4,5% i altres un 2%. Aquestes mutacions s'han trobat en individus tant en homozigosi com en heterozigosi, sent els afectats aquells qui presenten una mutació en homozigosi o dues mutacions diferents, heterozigots compostos (la resta, són portadors asimptomàtics).

Exó	Mutacions DNA	Mutacions proteïna	Número individus afectats	Incidència	Referències
2	c.109_110delC	p.L37fsX	1	1	Montagna et al., 2006
2	c.110_111insGC	p.G38RfsX20	2	2	Boor et al., 2006
2	c.135_136insC	p.C46fsX34	35	40	Leegwater et al., 2002; Ben-Zeev et al., 2002; Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 2004; Tinsa et al., 2008.
2	c.135_136delT	p.C46fsX57	1		Tinsa et al., 2008
2	c.176G-A	p.G59E	11	11	Ben-Zeev et al., 2002
2	c.177_178delG	p.S60DAfsX5	2	1	Patrono et al., 2003
2	c.177+1G-T	Splice defect	1	1	Patrono et al., 2003
2	c.178-10T-A	Splice defect	1	1	Boor et al., 2006
3	c.206C-T	p.S69L	1	1	Boor et al., 2006
3	c.213C-G	p.Y71X	2	2	Leegwater et al., 2001
3	c.237A-G	p.M80V	1	1	Montagna et al., 2006
3	c.240G-A	p.M80I	1	1	Boor et al., 2006
3	c.249G-T	p.L83F	3	2	Leegwater et al., 2002; Patrono et al., 2003; Montagna et al., 2006
3	c.250C-T	p.R84C	1	1	Boor et al., 2006
3	c.251G-A	p.R84H	2		Riel-Romero et al., 2005
3	c.255T-G	p.C85W	2	1	Leegwater et al., 2002
3	c.263G-T	p.G88V	3	3	Patrono et al., 2003; Koussa et al., 2005

3	c.268-1G-A	Splice defect	1	1	Boor et al., 2006
4	c.268_422del	p.C90_I141del	2	1	Leegwater et al., 2002
4	c.274C-T	p.P92S	5	6	Ben-Zeev et al., 2002; Leegwater et al., 2002; Montagna et al., 2006
4	c.278C-T	p.S93L	9	18	Leegwater et al., 2001; Tsujino et al., 2003; Saijo et al., 2003; Montagna et al., 2006; Morita et al., 2006
4	c.298_423+108del	p.T99fsX	1	1	Boor et al., 2006
4	c.322-1G-A	Splice defect	1		DeGrauw et al., 2009
5	c.323delT	p.I108fs	1	1	Montagna et al., 2006
5	c.337-353del+G	p.I113GfsX2	1	1	Tsujino et al., 2003
5	c.353C-T	p.T118M	1	1	Leegwater et al., 2002
5	c.353C-G	p.T118R	1	1	Leegwater et al., 2001
5	c.357_358insT	p.A120CfsX60	2	2	Patrono et al., 2003
5	c.373T-C	p.C125R	1	1	Leegwater et al., 2002
5	c.387G-A	p.G130R	1	1	Montagna et al., 2006
5	c.422A-G	p.N141S	1	1	Leegwater et al., 2002
5	c.423C-A	p.N141K	2	2	Leegwater et al., 2002; Patrono et al., 2003
5	c.423+3_423+4insT	Splice defect	1	1	Leegwater et al., 2001
5	c.423+6G-T	Splice defect	1	2	Patrono et al., 2003
5	c.423+1G-A	Splice defect	5	5	Leegwater et al., 2001; Bugiani et al., 2003; Patrono et al., 2003; Riel-Romero et al., 2005
6	c.449-455del	p.L150RfsX8	5	3	Leegwater et al., 2001
6	c.460_461insGGAGC	p.L154GfsX8	1	1	Leegwater et al., 2001
6	c.470C-A	p.A157E	1	1	Gorospe et al., 2004
6	c.514-515delAA	p.C171fs	1	1	Montagna et al., 2006
7	c.594-597del	p.Y198X	4	8	Leegwater et al., 2001, 2002
7	c.597_598delA+33	p.G206X	1	1	Boor et al., 2006
7	c.597+1G-A	Splice defect	1	1	Boor et al., 2006; DeGrauw et al., 2009
8	c.603G-A	p.E202K	1	1	Montagna et al., 2006
8	c.629T-A	p.V210D	1	1	Leegwater et al., 2002
8	c.634G-A	p.G212R	1	2	Leegwater et al., 2001
8	c.635G-A	p.G212E	1	1	Leegwater et al., 2002
8	c.714+1G-A	Splice defect	1	1	Boor et al., 2006
9	c.733G-C	p.A245P	2	2	Pascual-Castroviejo et al., 2005, Boor et al., 2006
9	c.736A-C	p.S246R	1	1	Leegwater et al., 2002
10	c.805C-A	p.S269Y	1	1	Montagna et al., 2006
10	c.823C-A	p.A275N	1	1	Montagna et al., 2006
10	c.839C-T	p.S280L	1	1	Leegwater et al., 2001
10	c.849_859delC	p.I282fsX	1	1	Patrono et al., 2003
10	c.880C-T	p.P294L	3	1	Patrono et al., 2003
10	c.895-1G-C	Splice defect	1	1	Patrono et al., 2003
10	c.895-2A-G	Splice defect	3	1	Leegwater et al., 2001
11	c.908-918delinsGCA	p.V303GfsX95	1	2	Leegwater et al., 2001; Rubie et al., 2003
11	c.910-915del	p.L304-L305del	1	1	Bugiani M et al., 2003; Rubie et al., 2003
11	c.929insGCT	p.L310_311insL	1	1	Montagna et al., 2006
11	c.959C-A	p.T320K	1	1	Boor et al., 2006
11	c.976T-C	p.C326R	1	2	Leegwater et al., 2002
11	c.1060-2A-G	Splice defect	1	1	Leegwater et al., 2001
12	g.240706_251959del	p.Q355fsX10	1	1	Boor et al., 2006

Taula 1. Mutacions identificades en el gen *MLC1* en pacients amb MLC (fs: canvi de pauta de lectura)

MLC és una malaltia rara amb una baixa prevalença en la població general, però té una elevada incidència en poblacions amb una elevada consanguinitat, com la turca (Topcu et al., 1998). També és el cas de la població d'Agarwals de la Índia on pràcticament la totalitat d'individua presenten la inserció 135insC en homozigosi (Gorospe et al., 2004; Singhal et al., 2003). Un altre

exemple és la mutació G59E dels jueus de Líbia (Ben-Zeev et al., 2002), o la dels japonesos, que solen presentar la mutació puntual S93L (Saijo et al., 2003; Tsujino et al., 2003).

Altres autors han descrit la implicació del gen *MLC1* en un subtipus d'esquizofrènia catatònica ja que han trobat una mutació puntual (L309M) en el gen (Meyer et al., 2001; Mirnics and Lewis, 2001). En canvi, nombrosos grups d'investigació desmenteixen aquesta implicació (Bettecken et al., 2002; Devaney et al., 2002; Ewald and Lundorf, 2002; Jorgensen et al., 2002; Kaganovich et al., 2004; Leegwater et al., 2002; McQuillin et al., 2002; Rubie et al., 2003). Estudis més recents però, han fet créixer la controvèrsia al respecte ja que s'han descrit noves mutacions en el gen *MLC1* com la V210I, L308Q o la R328H implicades en l'esquizofrènia catatònica i el trastorn bipolar efectiu en una família de la Índia (Verma et al., 2005).

Amb les dades conegudes de MLC es pot dir que la penetrància és completa. No s'ha pogut trobar una correlació genotip-fenotip (Leegwater et al., 2001; Leegwater et al., 2002) ja que la severitat del fenotip dels pacients de MLC no correlaciona amb les mutacions trobades.

5.2.2. Expressió del gen *MLC1* en teixits del sistema nerviós

El primer estudi de localització de l'expressió del gen *Mlc1* en ratolí adult va determinar la localització del mRNA en cèl·lules glials, com astròcits de la glia de Bergmann i cèl·lules endodurals (Schmitt et al., 2003), per hibridació *in situ*. Es va detectar una elevada expressió en el cerebel i en el bulb olfactori. També es va observar un patró d'expressió diferenciat durant el desenvolupament del cervell: es començava a detectar en l'etapa prenatal (E14) i arribava al seu pic màxim el dia post-natal 5. Es va corroborar i ampliar aquesta observació en un estudi realitzat pel nostre grup (Teijido et al., 2004), on es va trobar una elevada expressió del mRNA en l'escorça cerebelar, en la capa de cèl·lules de Purkinje (cèl·lules de la glia de Bergmann) i en la làmina molecular. També es va observar mRNA en determinades barreres cerebrals, concretament en cèl·lules endodurals envoltant el tercer ventricle i els ventricles laterals, en les regions subpials i perivasculars. També es va detectar expressió en cossos cel·lulars neuronals de les neurones piramidals de l'escorça, neurones granulars a l'hipocamp, i en diferents nuclis del cervell mitjà i del tronc encefàlic.

En un estudi d'*arrays* en glioblastomes primaris que sobreexpressaven el receptor del factor de creixement epidermal (EGFR), es va trobar també sobreexpressat el gen de *MLC1* (Mischel et al., 2003), suggerint que *MLC1* podria estar regulat per aquest factor.

5.3. LA PROTEÏNA MLC1

El gen codifica per una proteïna de membrana que porta el mateix nom (Leegwater et al., 2001; Teijido et al., 2004), formada per 377 aminoàcids (la proteïna humana), i té un pes molecular

d'aprox. 41 kDa. Segons prediccions bioinformàtiques, la proteïna consta de 8 dominis transmembrana units per 4 dominis extracel·lulars (*loops*) petits (5-8 aa) i 3 dominis intracel·lulars, dos d'ells curts (7-9 aa) i un més llarg, que divideix la proteïna en dues regions pràcticament simètriques entre si. Els dos extrems amino-terminal (N-terminal) i carboxi-terminal (C-terminal) són intracel·lulars (figura 12).

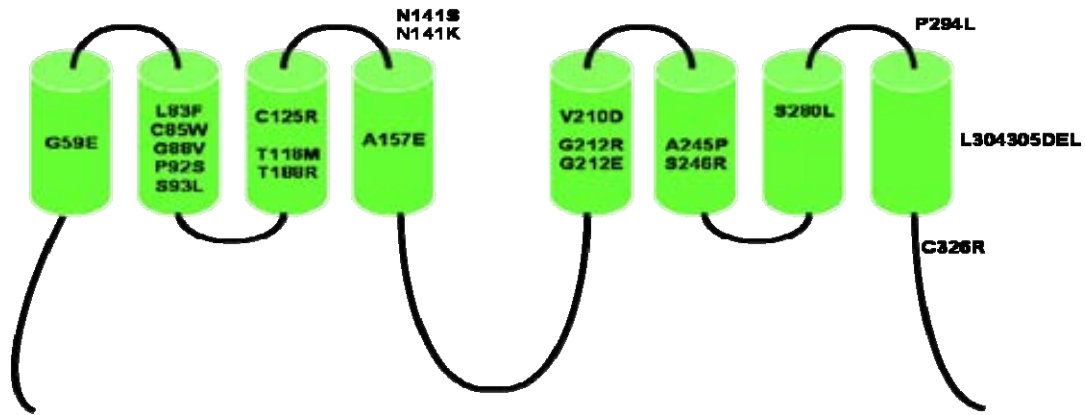


Figura 12. Representació esquemàtica de la proteïna MLC1 humana, segons prediccions bioinformàtiques. Es mostren els 8 dominis transmembrana, els 4 *loops* extracel·lulars, els 4 *loops* intracel·lulars i els extrems amino-terminal i carboxi-terminal. Sobre l'estructura es mostren les mutacions estudiades en el present treball.

5.3.1. Ortòlegs de la proteïna

S'ha realitzat un alineament de la seqüència de varis ortòlegs de la proteïna MLC1 corresponents a diferents espècies de mamífers, aus i peixos per poder realitzar comparacions estructurals, utilitzant el programa CLUSTALW Sequence Alignment (Baylor College of Medicine). La proteïna no s'expressa ni en llevats, ni en *Caenorabditis elegans* ni en *Drosophila*, sinó que es comença a expressar en cordats (figura 13).

La figura 13 mostra l'alineament de 13 ortòlegs diferents de MLC1. Els 8 segments transmembrana predits estan ombrejats en gris, els dominis N i C-terminals en requadres i el *loop* intracel·lular que uneix els dominis transmembrana IV i V, està subratllat. Els residus conservats en totes les espècies estan marcats amb un asterisc. Com es pot observar, les regions transmembrana i la regió final de l'extrem C-terminal estan molt conservats en la majoria d'espècies, fet que indica una identitat funcional d'aquesta última regió. En canvi, la regió N-terminal és molt diferent entre les diverses espècies, fet que ens suggereix que no és una regió important pel funcionament de la proteïna.

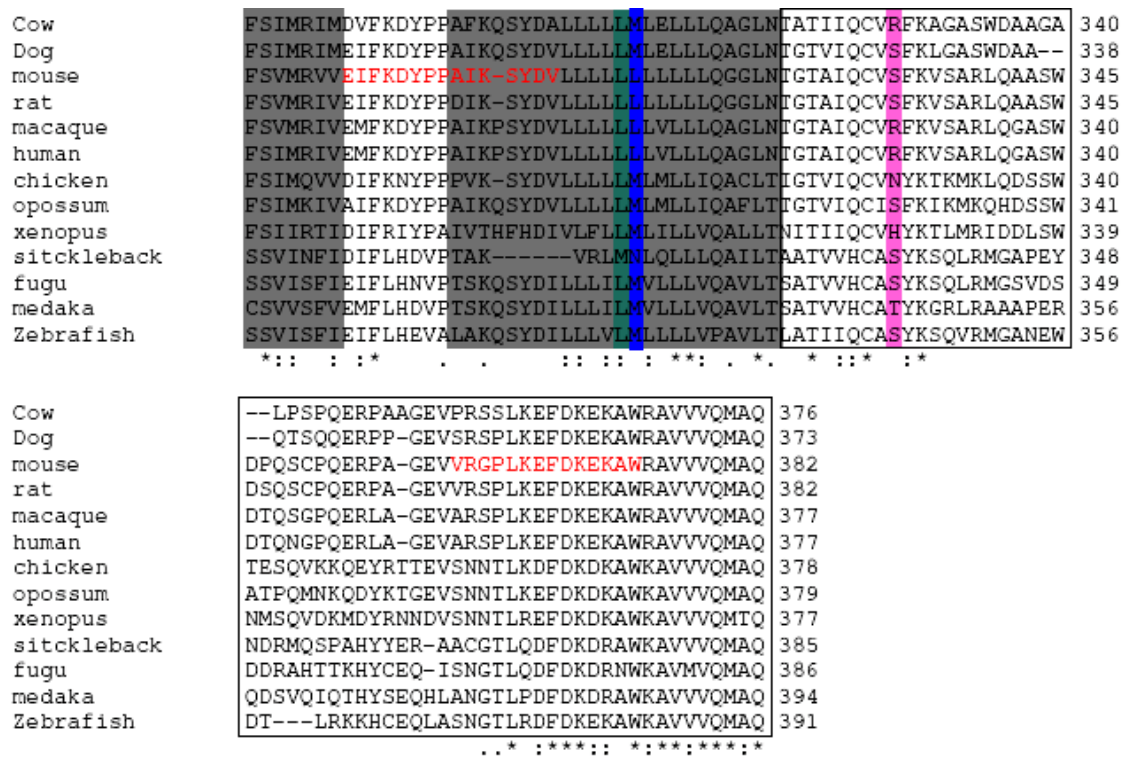


Figura 13. Alineament de la seqüència de la proteïna MLC1 en 13 espècies diferents. Els 8 segments transmembrana estan sombrejats en gris, i els residus conservats marcats amb un asterisc. Les mutacions associades a pacients amb esquizofrènia catatònica estan marcades en groc (V210I), verd (L308Q), blau (L309M) i rosa (R328H). En vermell es mostren els aminoàcids contra els quals s'han dirigit els diferents anticossos, tant en la proteïna humana com en la de ratolí.

5.3.2. Expressió de la proteïna MLC1

El patró d'expressió de la proteïna MLC1 en ratolí és molt semblant al patró del gen *Mlc1*. Per tècniques d'immunohistoquímica i microscopia electrònica (EM) es va localitzar l'expressió de MLC1 en cervell adult de ratolí, en els astròcits de la glia de Bergmann, en els processos astrocitaris al voltant dels vasos sanguinis i en la membrana d'unió entre astròcits (Teijido et al., 2004). També es va detectar la proteïna en els tractes axonals de les neurones però no en els oligodendròcits.

Estudis en mostres humanes van mostrar l'expressió de MLC1 a leucòcits (limfòcits, monòcits i granulòcits) (Boor et al., 2005). També es descriu l'expressió de MLC1 en teixit cerebral humà, concretament als processos astro-glials al voltant de vasos sanguinis a l'escorça, als astròcits de la glia de Bergmann a cerebel, a la capa subpendimal i als processos astrocitaris de la pia.

Posteriorment, en un estudi detallat del desenvolupament de ratolí, es va descriure l'expressió de la proteïna MLC1 en tractes axonals als primers estadis de desenvolupament en el sistema nerviós central (SNC), però no en la mielina en estadis posteriors (Teijido et al., 2007). MLC1 s'expressava en el sistema nerviós perifèric (SNP), concretament en l'epiteli sensorial, en l'oïda interna, en la retina, en el nervi òptic i ciàtic, i en la medul·la. També es va precisar la localització

de MLC1 a la membrana de contacte entre astròcits. Aquests resultats demostraven que MLC1 no formava part del complex distrofina-glicoproteïna (DGC), ja que aquest està situat a la membrana perivascular en contacte amb la làmina basal. Aquest fet va generar controvèrsia ja que seguidament, altres grups van publicar treballs on localitzaven MLC1 associat al DGC a *lipid-rafts* (Ambrosini et al., 2008), interaccionant amb Kir4.1 (Boor et al., 2007), i molt recentment s'ha descrit que MLC1 interacciona amb caveolina-1 i α -tubulin en estructures vesiculars (caveoles i caveosomes). Aquests estudis apunten que la proteïna MLC1, en astròcits, està distribuïda al voltant del nucli, en vesícules en el Reticle Endoplasmàtic i en el Complex de Golgi, i rarament es troba a la membrana plasmàtica. Per primer cop, descriuen la presència de 2 llocs de fosforilació per la proteïna quinasa C i A (PKC i PKA) a la Ser27 i Ser339 (Lanciotti et al., 2010).

5.3.3. Mutacions en la proteïna MLC1

L'impacte funcional de les mutacions de *MLC1*, anteriorment descrites (taula 1), ha estat un dels aspectes que el nostre grup ha estudiat. La dificultat rau en que no es poden realitzar mesures funcionals dels mutants de la proteïna, ja que no es coneix la funció. Un primer treball, on s'estudien algunes mutacions de MLC1 com les mutacions T118M, G212R, S280L i C326R associades a MLC, i la mutació L309M associada a l'esquizofrènia, va revelar una disminució en l'estabilitat de la proteïna i una reducció en els nivells d'aquesta a la superfície de la membrana (Teijido et al., 2004), suggerint que les mutacions causaven un mal plegament de la proteïna, el qual revertia parcialment en presència de Curcumina (inhibidor de Ca^{2+} -ATPasa del reticle endoplasmàtic). Recentment, l'estudi de dues mutacions més en astròcits, S280L i S246R, localitzaven la proteïna majoritàriament a la zona perinuclear i, una part de la proteïna mutada S246R, a la membrana plasmàtica (Lanciotti et al., 2010).

5.3.4. Estructura i funció de la proteïna MLC1

Degut a la dificultat de cristal·litzar les proteïnes de membrana, l'estructura de MLC1 encara no s'ha abordat. En estudis de biologia molecular, es va observar que la proteïna, amb un pes molecular de ~41 kDa, tenia una mobilitat electroforètica de ~37 kDa degut a seva elevada hidrofobicitat, i apareixien dues bandes més a ~70 i ~115 kDa corresponents a un dímer i a un trímer d'aquesta (Teijido et al., 2004). També es va observar, a través d'estudis de tràfic de proteïnes que, la proteïna MLC1 oligomeritza amb ella mateixa i, aquesta unió, no era dependent de ponts disulfur. Actualment, mitjançant nous estudis d'interacció en cèl·lules, el grup ha pogut corroborar l'oligomerització de MLC1.

Segons prediccions bioinformàtiques, MLC1 té una baixa homologia amb el canal *Shaker-like voltage-gated potassium channel* (Kv1.1), però no s'han pogut registrar corrents de K^+ produïts per MLC1. El fenotip vacuolitzant dels pacients amb MLC, fa pensar que podria funcionar com un canal, subunitat d'un canal o transporador relacionat amb l'homeostasi de l'aigua, encara que fins

el moment no s'ha pogut detectar cap tipus d'activitat associada a MLC1 (Teijido et al., 2004). Com a punt interessant, voldria esmentar que el ratolí *knock-out* (KO) de *Kv1.1* presenta unes característiques fenotípiques en homozigosi de macrocefàlia, deteriorament motor progressiu i atacs parcials d'epilèpsia (Persson et al., 2007). L'anàlisi del patró d'expressió de gens amb microarrays en aquest KO va mostrar una repressió del mRNA de *MLC1*, la qual es veia augmentada en presència de l'antiepilèptic carbamazepine (Almgren et al., 2008). També es va observar que el KO heterozigot de *RFX4_v3* (factor de transcripció important pel desenvolupament del cervell), el qual presentava hidrocefàlia congènita, hi havia una repressió de l'expressió del gen *MLC1*, probablement degut a la manca d'unió d'aquest factor a la seqüència X-box del promotor de *MLC1* (Zhang et al., 2006).

5.4. TRACTAMENT DELS PACIENTS DE MLC

Degut al desconeixement de la funció de la proteïna MLC1, no és possible entendre el mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Per aquest motiu, no s'ha pogut desenvolupar cap tractament pels pacients. És per això que, de moment, només és possible aplicar mètodes pal·liatius dels diferents símptomes de la malaltia, o disminuir la incidència d'aparició d'aquesta gràcies al diagnòstic prenatal.

5.5. DIAGNÒSTIC PRENATAL

Una vegada conegudes les mutacions responsables del fenotip de MLC, és possible oferir, en una família concreta, tant el diagnòstic de portadors com el diagnòstic prenatal de la malaltia. És a dir, és possible predir l'estat del fetus en un nou embaràs. És necessari poder distingir entre un cromosoma mutat i el que no ho està, per això, s'han de conèixer les mutacions d'un fill malalt d'una família concreta. En qualsevol cas, és possible donar consell genètic a totes les famílies, el qual pot ser més o menys complert, en funció del coneixement genètic que es tingui de la família. El diagnòstic prenatal es pot realitzar per amniocentesi (entre les setmanes 16 i 18 de gestació) o bé mitjançant una biòpsia corial (entre la setmana 9 i la 12 de gestació), sent aquest últim el més indicat per evitar l'angoixa de la mare. Fins al moment, s'han dut a terme dos diagnòstics prenatals de dues famílies de la comunitat Agarwal, totes dues amb la mutació comuna del gen *MLC1* c.135_136insC, utilitzant biòpsia corial a 12 setmanes de gestació pel mètode PCR-RFLP (Shukla et al., 2008). En les dues famílies, on els pares eren heterozigots i tenien un fill afectat, homozigot per la mutació c.135_136insC, els anàlisis van mostrar que els fetus va estaven afectats en homozigosi en ambdós casos.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

La Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC) és una malaltia genètica de la qual no es coneix el mecanisme patològic i conseqüentment, no existeix un tractament específic pels pacients. Per aquest motiu, l'objectiu general d'aquesta tesi va ser aconseguir avançar en el coneixement de la malaltia a través de models que ens permetessin estudiar la proteïna MLC1 a nivell bioquímic i funcional.

Els objectius inicials d'aquesta tesi van ser:

1- Generació d'un model animal per tal d'entendre la fisiopatologia de la malaltia MLC.

Aquest objectiu englobava la generació d'un model de ratolí *knock-out* (KO) condicional de *Mlc1*. Calia que fos condicional per evitar letalitat embrionària, ja que no coneixíem com afectava la manca de la proteïna durant desenvolupament. Un cop obtingut el model de MLC, es volia caracteritzar el seu fenotip a nivell bioquímic, histològic i de comportament.

2- Obtenció d'eines per estudiar la proteïna MLC1 en humans. Caracterització de la proteïna en els pacients afectats amb MLC.

La caracterització de la proteïna MLC1 a ratolí estava molt ben definida, però l'estudi en humans no s'havia pogut realitzar per falta d'eines. Per desenvolupar aquest objectiu, es volien obtenir anticossos contra la proteïna MLC1 humana, per tal de poder fer els estudis de l'expressió de la proteïna en humans, i en col·laboració amb la Dra. Marjo Van der Knaap, poder fer una caracterització dels pacients de MLC amb mutacions en el gen *MLC1*.

3- Caracterització d'un model cel·lular per a l'estudi de MLC1 a nivell bioquímic i funcional.

Degut a la dificultat de generar el model animal, l'objectiu següent era trobar un model cel·lular on poder estudiar la proteïna a nivell bioquímic. Aquest objectiu englobava l'obtenció del model cel·lular, la generació del model *knock-down* de la proteïna MLC1 i la seva caracterització, a fi i efecte d'acostar-nos a la possible funció de MLC1.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

En el present treball s'han construït diferents vectors d'expressió en bacteris i cèl·lules eucariotes, vectors adenovirals, microRNAs, proteïnes de fusió, etc. S'ha utilitzat la tècnica de clonació clàssica i el sistema de clonació per recombinació de la casa Invitrogen (*Gateway System*). També s'han utilitzat tècniques de proteïnes per estudiar tant l'expressió i localització de diferents proteïnes en cultius cel·lulars, com les interaccions d'aquestes. Per tal d'intentar esbrinar la funció de MLC1, s'han utilitzat diferents tècniques d'imatge.

1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. CLONATGE DE DNA PLASMÍDIC

Les diferents tècniques de biologia molecular actuals permeten la manipulació i la modificació de fragments de DNA amb relativa facilitat. Avui en dia, és relativament fàcil i ràpid dissenyar i construir vectors específics per a una aplicació o un assaig experimental concret. Es poden construir o comprar una ampla gamma de vectors de aplicació diversa: vectors d'expressió proteica de bacteris o mamífers, vectors vírics (lentivirus, adenovirus, retrovirus), vectors per assajos d'interacció proteica (doble híbrid o d'assaig de complementació fluorescent), etc.

1.1.1. Reacció de PCR

La reacció de PCR en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) és un sistema *in vitro* que permet l'amplificació de fragments de DNA de doble cadena de manera exponencial, utilitzant una polimerasa termostable i encebadors específics pel fragment de DNA a amplificar (Saiki *et al.*, 1988). Consisteix en cicles successius de desnaturalització de la doble cadena del DNA, d'hibridació de la cadena senzilla a l'encebador (el qual és complementari a la seqüència del DNA) i d'extensió de les cadenes mitjançant una polimerasa. En cada cicle, idealment, es dobla el nombre de còpies del fragment de DNA. Cada fragment de DNA a amplificar presenta unes característiques diferents, igual que els encebadors i la polimerasa. Per aquest motiu, cada reacció de PCR vindrà condicionada per les diferències anteriors (per ex., la puresa i concentració del DNA de partida, la llargada del fragment a amplificar, etc.) i per tant, s'han d'optimitzar les condicions apropiades. A continuació s'explica una PCR estàndard utilitzada:

100ng/µl de DNA motlle	4 µl
Encebador (sentit) 10 µM	4 µl
Encebador (antisentit) 10 µM	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	5 µl
Tampó Pol.	10 µl
DNA Pol.	2 µl
Aigua milliQ	69 µl
Volum final	100 µl

La reacció de PCR es fa en tubs de 0.2 o 0.5 ml i s'incuba en un termociclador amb un programa predeterminat. Quan es realitza una primera PCR cal optimitzar el procés, variant els diferents paràmetres de la reacció. Les condicions generals per a una PCR clàssica són les següents:

Inici: 3 min a 95°C	} 25-35 cicles
Desnaturalització: 30 segons a 95°C	
Hibridació: 30 segons a 46-62°C	
Elongació: Entre 30 segons y 4 min a 74°C	
Elongació final: 5-10 min a 74°C	

Finalment es deixa a 4°C o a temperatura ambient.

Els temps d'elongació depenen de la longitud del fragment a amplificar (generalment 1 min per 1 kb); i la temperatura de hibridació depèn de la seqüència de l'encebador. Es calcula en °C, mitjançant la següent fórmula:

$$T_m = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 4$$

1.1.1b. Reacció de PCR mètode SOE (*splicing by overlap extension*)

Aquest tipus de PCR ens permet introduir mutacions al DNA, insercions i delecions relativament llargues. La tècnica consisteix en realitzar, primer, 2 fragments de PCR que contenen la mutació. Aquests dos fragments contenen una regió de solapament que és igual i que conté la mutació que permet fer-los servir com a motlle per a la següent PCR de recombinació, fent servir els encebadors dels extrems 5' i 3', esquematitzat en la figura 14.

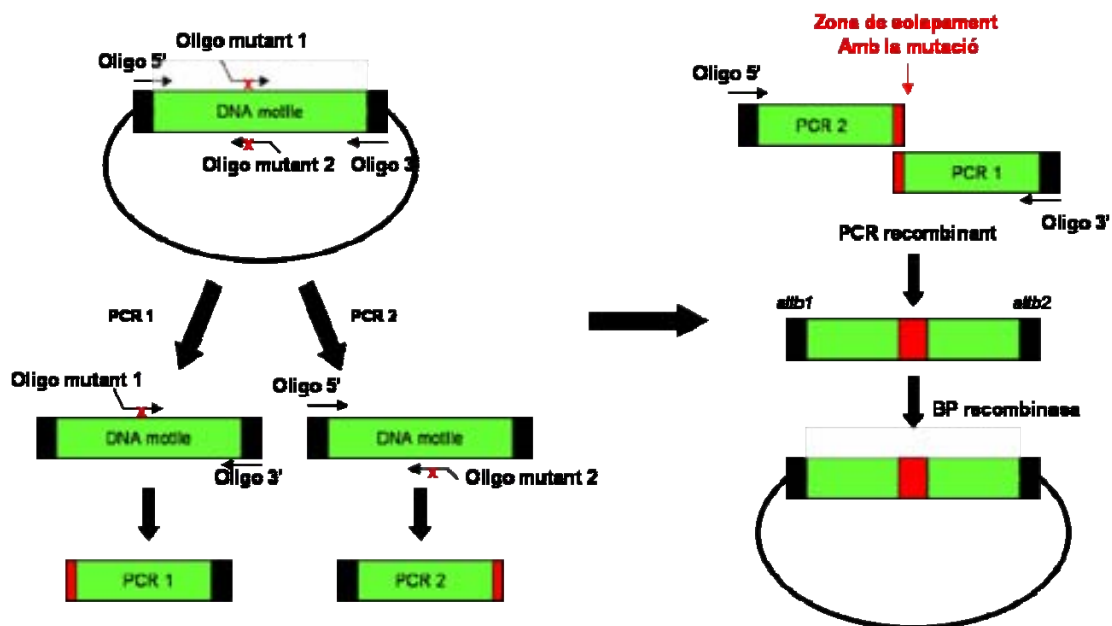


Figura 14. Esquema gràfic del mètode de mutagènesi per PCR SOE. Primer, es realitzen 2 PCRs parcials (PCR1 i 2) utilitzant els encebadors que contenen la mutació obtenint així 2 fragments amb una zona de solapament (en vermell) que és igual i conté la mutació. A continuació, els 2 fragments s'amplifiquen en una PCR recombinant amb els encebadors dels extrems 5' i 3' obtenint el DNA amb la mutació d'interès, que és clonat per Gateway en un vector per generar l'*entry clone* (també es pot fer per digestió-ligació).

Un cop s'ha obtingut el fragment de DNA amb la mutació es clona en el vector d'interès, ja sigui pel mètode clàssic o pel mètode *Gateway*.

Com s'ha explicat anteriorment, les condicions de PCR són específiques per cada DNA i encebadors, però una reacció estàndard seria:

<u>PCR parcials</u>		<u>PCR recombinant</u>	
DNA motlle (100 ng/μl)	2μl	PCR1	5μl
Oligo sense (10 μM)	2μl	PCR2	5μl
Oligo antisense (10 μM)	2μl	Oligo sense (10 μM)	2μl
dNTPs (10 μM)	1μl	Oligo antisense (10 μM)	2μl
MgCl ₂ (2 mM)	2,5 μl	dNTPs (10 μM)	1μl
Tampó Pfu 10x	5μl	MgCl ₂ (2 mM)	2,5 μl
Pfu polimerasa	1μl	Tampó Pfu 10x	5μl
Aigua Milli-Q	34,5μl	Pfu polimerasa	1μl
		Aigua Milli-Q	26,5μl
Volum total : 50 μl			

Les PCRs es verifiquen en un gel d'agarosa, es purifiquen (apartat 1.1.2.4.) i es clonen com s'explica a continuació.

1.1.2. Clonació clàssica

1.1.2.1. Digestió amb enzims de restricció

Les digestions de DNA amb enzims de restricció s'utilitzen pel clonatge de fragments en plàsmids amb la subsegüent lligació. El clonatge amb enzims de restricció es basa en la característica que tenen aquestes endonucleases de tallar el DNA en dianes específiques, generant extrems (cohesius o roms) que poden ser relligats en el vector d'interès mitjançant un enzim de lligació.

Els tampons dels enzims venen a 10x i s'usen a una concentració final de 1x. Pel que fa als enzims, s'han utilitzat de 1 a 10 U/μg de DNA, sense superar mai el 10% del volum final de la reacció, ja que una concentració superior al 5% inhibeix l'activitat enzimàtica. Normalment les digestions s'efectuen a 37°C, a excepció d'alguns enzims, durant 1-16 hores, depenent de l'eficiència de digestió i de la quantitat de DNA. Es poden efectuar digestions dobles en el cas que la compatibilitat dels dos enzims ho permeti. Si no es així, cal efectuar primer una digestió, córrer la mostra en un gel d'agarosa, tallar la banda i purificar-la, per realitzar després una segona digestió.

1.1.2.2. Electroforesis del DNA en gels d'agarosa

Per validar la integritat d'un DNA, la qualitat d'una digestió i els fragments generats, així com per a la purificació de fragments d'interès, es realitza l'electroforesis en gels d'agarosa no desnaturalitzants. Els fragments de DNA de doble cadena migren a una velocitat inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. Juntament amb el DNA d'estudi es carreguen marcadors de pes molecular conegut per tal d'identificar els diferents fragments de DNA.

Materials i reactius

- Cubeta d'electroforesis.
- Font de corrent elèctrica.
- TAE (Tampó Tris-acetat) 50X (2M Tris-base, 1M àcid acètic, 50 mM EDTA).
- Tampó de càrrega 5x (40 mM EDTA, 0.1% SDS, 30% Ficol 400, 0.2% blau de bromofenol).
- Gel d'agarosa: La concentració d'agarosa varia segons la mida de les bandes de DNA a visualitzar, normalment entre 0.5 i 3% en tampó TAE. Al gel s'hi afegeix bromur d'etidi a una concentració aproximada de 1 µg/ml.
- Marcadors de pes molecular.

Metodologia

1. Les mostres de DNA es preparen amb el tampó de càrrega a una concentració final 1x.
2. Es pesa l'agarosa segons el percentatge desitjat i el volum del gel, i es fa bullir amb tampó TAE 1x al microones fins que es dissol completament. Es deixa refredar i s'afegeix el bromur d'etidi. Es posa sobre la cubeta, on prèviament hem col·locat la pinta, i es deixa polimeritzar sota la campana.
3. Una vegada polimeritzat el gel, s'extreu la pinta i es col·loca en la cubeta d'electroforesis. El gel ha d'estar cobert completament per tampó d'electroforesis. A continuació es carreguen les mostres, juntament amb el marcador de pes molecular. La migració es produirà des del pol negatiu al positiu ja que el DNA té càrrega negativa degut a la presència de grups fosfat. Es sotmet el gel a un voltatge que varia segons la mida del gel, entre 60 i 120 V.
4. Finalitzada la migració, les bandes es visualitzen en un trans-il·luminador de llum ultraviolada i se'n fa una fotografia.

1.1.2.3. Purificació del DNA

Sovint es necessita purificar els fragments de DNA digerit de plàsmids o PCRs per tal d'efectuar un clonatge. Per això, primer cal realitzar una electroforesis en gel d'agarosa, i a continuació aïllar la banda d'interès per després purificar-la (també es pot purificar una digestió directament sense necessitat de fer-les correr un gel).

La purificació del DNA es fa utilitzant un kit comercial *High pure PCR product purification kit* (Roche), que es basa en l'acció d'un agent caotrópic que desnaturalitza proteïnes, dissol l'agarosa i promou la unió del DNA de doble cadena (en un rang 100 pb i 48 Kb) a una matriu cristal·lina. S'ha de tenir en compte que en aquest procés es perd una quantitat elevada de DNA.

La mostra es deixa migrar de manera que la banda d'interès estigui prou separada de les altres. A continuació, es talla la banda amb un bisturí, sota la llum ultraviolada de manera que es visualitzen els fragments de DNA, i es diposita en un tub eppendorf per a ser purificada seguint el protocol del fabricant.

1.1.2.4. Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina

El tractament amb fosfatasa alcalina té com a objectiu eliminar els grups 5'-fosfat del vector de DNA digerit. D'aquesta manera el vector no es pot rrelligar i augmenta l'eficiència de lligació amb l'insert, ja que té els seus propis grups 5'-fosfat lliures. A l'hora de defosforilar un DNA s'ha de tenir en compte que 2 µg de DNA contenen 1,4 pmols de fosfat 5', i que 1 U de fosfatasa alcalina (AP) és la quantitat d'enzim que defosforila 100 pmols de fosfat 5' en 30 min a 37°C.

1.1.2.5. Lligació

El procés de lligació es dona entre el vector (digerit, purificat i defosforilat) i l'insert, unint els seus extrems cohesius de manera direccional o els extrems roms de manera no direccional. Per tal d'aconseguir extrems cohesius d'un fragment de DNA amb extrems roms, s'utilitza la polimerasa Klenow. La reacció de lligació està catalitzada per la T4-DNA lligasa que catalitza la formació d'un enllaç fosfodiéster entre l'extrem 5' fosfat i el 3' hidroxil en un DNA de doble cadena. Quan es realitza una reacció de lligació es recomanable efectuar els següents controls:

- Control negatiu de lligació: Transformació del vector digerit i insert sense lligasa.
- Control positiu de transfecció: Transformació d'una construcció coneguda que funciona bé.
- Control negatiu de transformació: Es plaquegen bactèries no transformades.

Una lligació ha funcionat bé quan creixen moltes més colònies en la lligació problema que en el control negatiu de lligació, i cap en el control negatiu de transformació.

Normalment, el procés de lligació s'efectua en un volum final de 10 µl, 1 µl de T4 DNA-ligasa (NEB) i 1 µl de tampó de ligasa 10x. La relació insert:vector es pot variar en funció de la llargada d'ambdós i segons la fórmula:

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times \text{mida insert (kb)}}{\text{mida vector (kb)}} \times \frac{6}{1} = \text{ng insert}$$

La reacció es deixa incubar a 4-16°C durant 14-16 hores. La lligació es transforma en bactèries electrocompetents i es comprova per digestió i seqüenciació.

1.1.3. Clonació via sistema Gateway (Invitrogen)

El sistema Gateway d'Invitrogen és un mètode de clonatge basat amb el sistema de recombinació de lloc específic del *phage lambda*. Aquest sistema proporciona una manera més ràpida i eficient de transferir una seqüència de DNA a diferents vectors, comparada amb el sistema tradicional de clonatge mitjançant enzims de restricció. El mètode evita els passos de digestió, purificació i lligació, optimitzant el temps de clonatge. El sistema permet la transferència de l'insert d'un vector a un altre mitjançant la utilització d'un vector d'entrada (*Entry Clone*) capaç de recombinar amb tota una gamma de vectors destí, ja siguin d'expressió bacteriana, de mamífer, lentivirals, adenovirals, etc., com es representa de forma esquemàtica en la figura 15.

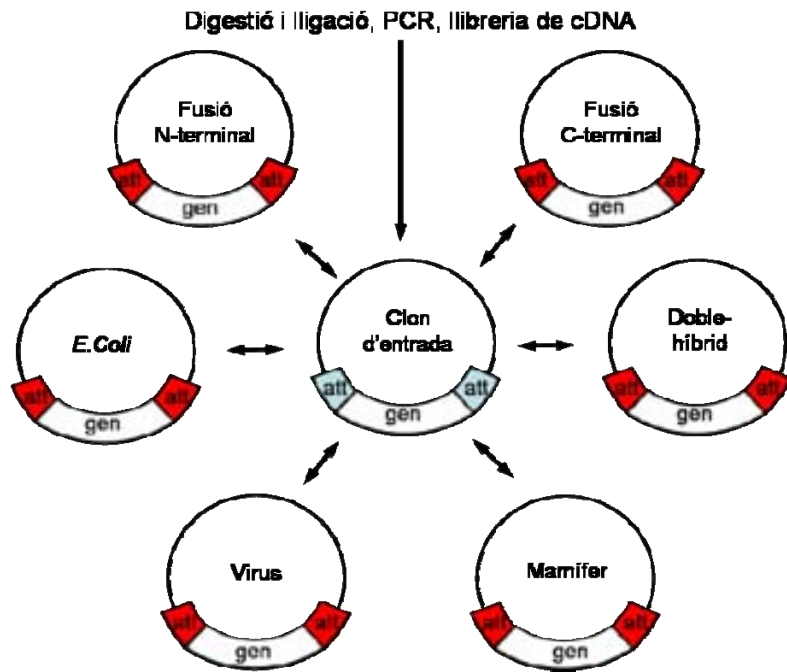


Figura 15. Esquema del sistema de clonació Gateway. Un cop clonat el DNA d'interès en l'*entry clone*, aquest pot ser transferit a d'altres vectors d'expressió de manera ràpida i fàcil. La transferència del DNA de la PCR a un vector, o d'un vector a un altre es fa per recombinació homologa gràcies a les zones recombinants atts.

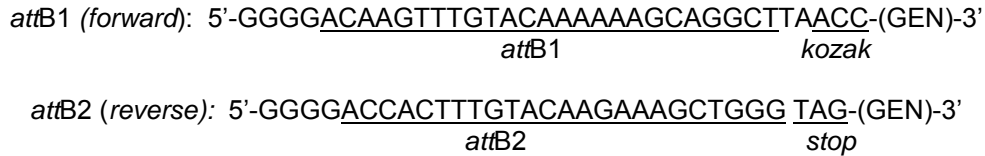
Mètode de recombinació del fag λ en *E. coli*: El sistema Gateway està basat en el cicle biològic del fag *lambda* i en el seu sistema de recombinació en *E. coli*. El fag, una vegada ha infectat la bactèria, integra el seu genoma en el de l'hoste gràcies a unes seqüències *att*, seqüències específiques d'unió amb proteïnes presents en el seu genoma i en el l'hoste. Així el fag recombinava el seu genoma, que es troba flanquejat per seqüències *attP* (243 pb) amb seqüències del genoma hoste *attB* (25 pb). La reacció d'integració la fa la proteïna Integrasa del fag i el factor d'integració de l'hoste (HIF). Com a resultat d'aquesta reacció es creen noves seqüències *att*, *attL* i *attR*, flanquejant el profag integrat. La reacció pot donar-se de forma inversa durant el procés d'escissió. *attL* i *attR* recombinen escindint el genoma del fag i reformant les seqüències *attB* i *attP*, permetent l'encapsulament del genoma víric amb proteïnes virals. En aquest cas la reacció és realitzada per la proteïna fàgica Escisionasa (Xis) i el HIF.

La reacció bidireccional és: $attB + attP \leftrightarrow attL + attR$

1.1.3.1 Clonatge amb el sistema Gateway simple

El sistema utilitza la maquinaria recombinatòria del fag *lambda* modificada per tal de permetre la recombinació *in vitro* de fragments de DNA. Seguint el protocol del proveïdor, el primer pas és dissenyar els oligonucleòtids encebadors que permetran introduir les seqüències *attB1* i *attB2* a banda i banda del fragment de DNA a recombinar, mitjançant una reacció de PCR. Una vegada s'aconsegueix flanquejar el fragment amb les seqüències de recombinació, es porta a terme la reacció de recombinació, ajuntant el fragment de PCR amb el vector donador pDONR 221 (proveït amb el sistema). Una vegada obtingut el clon d'entrada, podem clonar el nostre insert en qualsevol vector de destí (pDEST) que contingui el cassat de recombinació *attR*-*ccdB*.

Reacció *attB* x *attP*. Construcció de clons d'entrada: El primer pas per a la construcció d'un clon d'entrada és la construcció de la seqüència d'interès flanquejada per seqüències *attB1* i *attB2*, mitjançant reacció de PCR. Les seqüències del oligonucleòtids encebadors utilitzades es van dissenyar segons *Primer Design for the Gateway attB primers*, modificat per *Won Do Heo*, i són:



Les quatre guanines dels extrem 5' augmenten l'eficiència de la recombinasa. La seqüència *Kozak* (Kozak, 1991), amb una adenina a la posició -3 del codó d'inici (ATG), facilita que el ribosomes triïn el primer codó AUG del mRNA. A la seqüència de l'*attB2* s'hi afegeix un codó d'aturada de la traducció. Seguidament a les seqüències *attBs*, s'introdueixen de 18 a 25 pb del gen a clonar. Una vegada realitzada la PCR i obtingut el gen o fragment d'interès franquejat d'*attB*, es realitza la recombinació BP amb el pDONR (amb els *attPs*) per obtenir l'*entry clone* amb les seqüències *attL*. Aquest vector conté les seqüències *attP1* i *attP2* flanquejant un gen de selecció negativa, el gen *ccdB*, el qual interfereix amb la DNA girasa d'*E. coli*, inhibint el creixement de la majoria de soques d'*E. coli*. Externament a la regió de recombinació, el pDONR també porta un gen de selecció resistent a la kanamicina. D'aquesta manera, mitjançant la reacció *attB* x *attP* realitzada per la BP clonasa, obtenim un clon d'entrada (*Entry Clone*) resistent a la kanamicina i *ccdB* negatiu, amb el fragment clonat flanquejat per *attL1* i *attL2*.

En un tub eppendorf de 1.5 ml, s'ajunten els següents reactius (reacció optimitzada):

Producte de PCR - <i>attB</i> (20-50 fmoles)	3µl
pDONOR (150ng/µl)	1µl
BP clonase	1µl

En un volum final de 5 µl. La barreja s'incuba a 25°C, d'1h a tota la nit. La reacció s'atura afegint-hi 0,5 µl de Proteinasa K, a 37°C durant 10 min. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteries DH5α per electroporació. Es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar amb 50 µg/ml de kanamicina. Un cop extret el DNA i comprovat per digestió i seqüència, es procedeix amb el protocol.

Reacció *attL* x *attR*. Construcció de vectors de destí: La reacció de recombinació entre un clon d'entrada (que conté les seqüències *attL*) i el vector destí (que conté les seqüències *attR*) es fa gràcies a la LR clonasa, una combinació de HIF i l'escisionasa (Xis). El vector d'expressió resultant té resistència a ampilicil·lina per tal de seleccionar els clons recombinats. La reacció de recombinació *attL* x *attR*, resulta en la formació del vector d'expressió amb el fragment insertat flanquejat de seqüències *attB*.

En un tub eppendorf de 1.5 ml, s'ajunten els següents reactius (reacció LR optimitzada):

Vector Destí	150 ng
Entry clone 1	150 ng
TE o aigua MilliQ	5 µl (volum final)
LR clonasa	1 µl

La barreja s'incuba a 25°C d'1h a tota la nit. La reacció s'atura afegint-hi 0,5 µl de Proteinasa K, a 37°C durant 10 min. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bactèries DH5α per electroporació d'igual forma que amb els clons d'entrada. Es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar amb ampicil·lina a 100 µg/ml. Els vectors resultants són comprovats per digestió amb enzims de restricció i electroforesis en gel d'agarosa, i posterior seqüenciació.

1.1.3.2. Clonatge amb el sistema Gateway *MultiSite* de 2 fragments

El sistema Gateway ens permet construir vectors d'expressió de manera ràpida i eficient a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA en el cas del *multisite*. Aquesta tecnologia utilitza la recombinació específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en l'ordenació i orientació correctes. S'usa *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination* (Invitrogen). La diferència entre el *multisite* i l'anteriorment descrit es troba en les seqüències *atts*. En el cas de clonar 2 fragments, en un fragment de DNA s'introdueix per PCR les seqüències *attB1* i *attB5r*, i en l'altre fragment, les seqüències *attB5* i *attB2*. Aquests dos fragments de DNA es clonen en els seus vectors (pDONR™ 221 P1-P5r i pDONR™ 221 P5-P2, respectivament) per generar 2 *entry clones*, els quals es recombinaran amb el vector de destí mitjançant una reacció LR, generant el vector d'expressió, com es mostra en la figura 16.

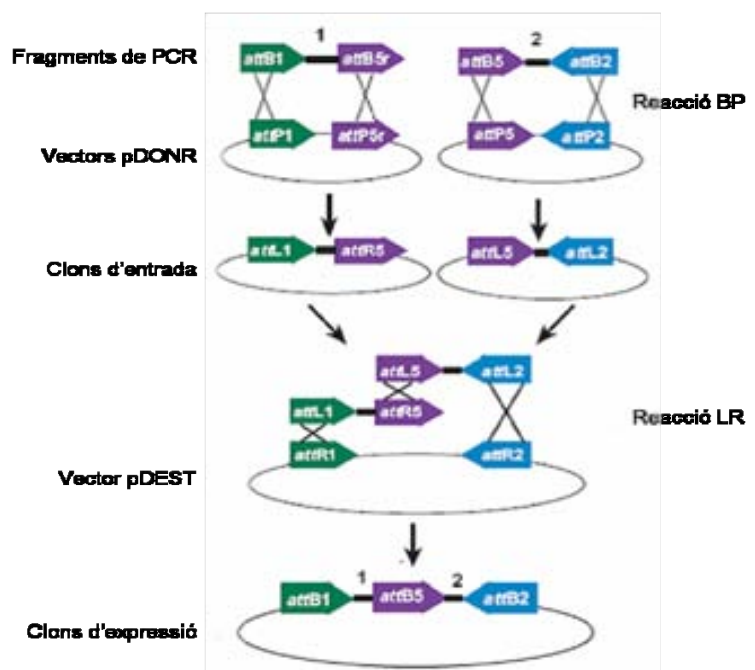


Figura 16. Esquema de la reacció de recombinació *multisite* de 2 fragments. Els productes de PCR amb els diferents *attBs* es recombinen amb els vectors pDONR corresponents per la reacció de BP clonasa. Un cop obtinguts els *entry clones*, aquests es recombinen entre ells i amb el vector destí mitjançant la reacció de LR, obtenint un vector d'expressió amb els dos fragments d'interès en l'ordre i la direcció correctes.

en la recombinació homòloga de dues seqüències iguals (Lee et al., 2001; Muyrers et al., 1999; Zhang et al., 1998). Aquesta metodologia s'utilitza per modificar el DNA introduint gens, mutacions puntuals, insercions i delecions, dianes de restricció, etc. (figura 17) (Angrand et al., 1999). En aquest treball, s'ha utilitzat la recombinació ET per construir el vector de recombinació, necessari per generar el model de ratolí *knock-out* condicional de MLC (Liu et al., 2003).

El mètode consisteix en introduir, a banda i banda del fragment de DNA que es vol insertar, unes regions amb la seqüència homòloga a la zona on es vol fer la recombinació. Aquestes seqüències homòlogues han de tenir ~50 bp i s'introdueixen per PCR. El producte de la PCR (DNA lineal) juntament amb el vector destí, s'introdueixen a *E.coli* perquè es pugui dur a terme la recombinació. La transformació del DNA lineal a *E.coli* produeix una ràpida degradació d'aquest, degut a l'exonucleasa RecBCD (Yu et al., 2000). Per evitar aquest procés, s'utilitzen soques d'*E.coli* que no expressen el gen *RecBCD*, com la soca DH10B, juntament amb un plàsmid que expressa les proteïnes recE i recT, proteïnes encarregades de la recombinació (Narayanan and Warburton, 2003).

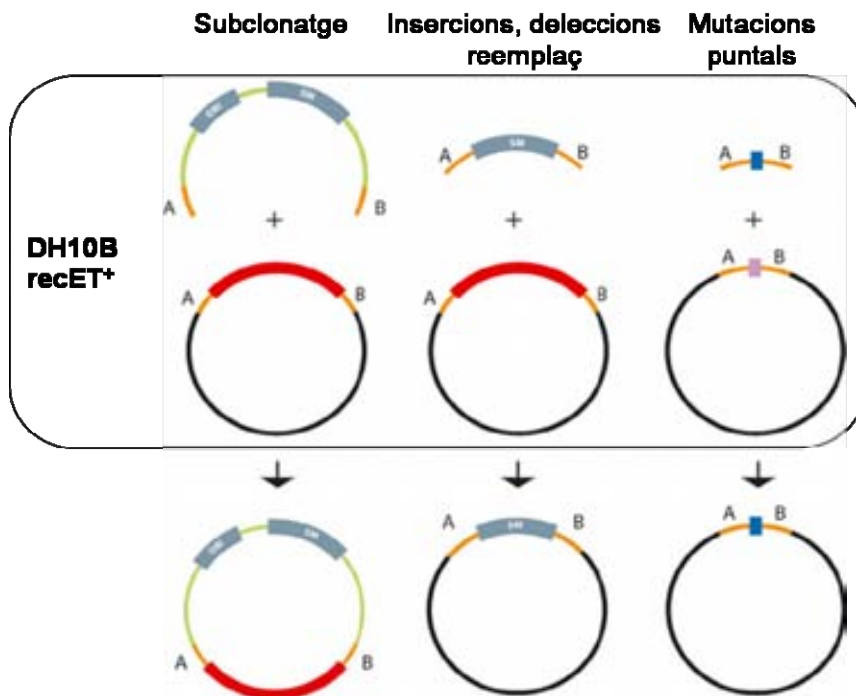


Figura 17. Representació esquemàtica de la recombinació ET en el subclonatge, insercions i delecions, reemplaçament i mutacions puntuals. El DNA que es vol insertar conté unes regions homòlogues (A i B) a la zona del vector a modificar, introduïdes per PCR. Els DNAs a recombinar es transformen en una soca d'*E.coli* que conté el plàsmid que expressa recE i recT, proteïnes encarregades de la recombinació (imatge modificada de la pàgina http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main_group=gene_analysis&sub1=target_vector_construction).

1.1.5. Generació de miRNAs

Igual que el RNA missatger (mRNAs), els microRNAs (miRNA) estan transcrits per gens però aquestes molècules petites de RNA, de 20-25 nt, no codifiquen per proteïnes. La seva funció és regular l'expressió gènica, ja sigui prevenint la traducció del mRNA a proteïna i/o induint la degradació del mRNA, a pràcticament tots els nivells: desenvolupament, fisiologia, metabolisme, etc., tant en animals com en plantes. S'han identificat aprox. 700 miRNAs en el genoma humà i la seva desregulació en l'expressió està implicada en varies malalties.

Els miRNAs es transcriuen gràcies a la RNA polimerasa II (poll) a partir d'un gen, d'un intró o d'una regió protomora, a un miRNA primari (pri-miRNA). Aquest pri-miRNA no codifica per proteïna i té una estructura de doble cadena en forma de pinça (*hairpin*) (figura 18). El pri-miRNA és processat en el nucli per l'endonucleasa Drosha Rnasa III que talla les dues cadenes de RNA alliberant un miRNA més curt, de ~60-70 nt anomenat pre-miRNA. Aquest tall es realitza a l'extrem lliure generant un fosfat a 5' i ~2 nt sobresortits a 3'. Aquest pre-miRNA és transportat del nucli al citoplasma per Ran-GTP i Exportin-5. En el citoplasma, el pre-miRNA és processat per l'enzim Dicer (Rnasa III, endonucleasa) que talla el RNA de doble cadena per la base del *loop* generant el miRNA madur. Aquest s'incorpora al complex de silenciament induït per RNA (RISC) on sembla que la cadena complementària del miRNA (miRNA*) és degradada. Els miRNAs dirigeixen el complex RISC a la repressió de l'expressió dels gens per dues vies:

(i) si la complementació entre el miRNA i el mRNA és perfecta, el complex RISC talla el mRNA (en la posició 10-11 del miRNA) i aquest és degradat; i (ii) si la complementació no és perfecta, el complex RISC reprimeix la traducció d'aquest. El tall del mRNA no causa cap modificació en el miRNA i això permet que aquest pugui reconduir el complex RISC per destruir més missatgers (Bartel, 2004).

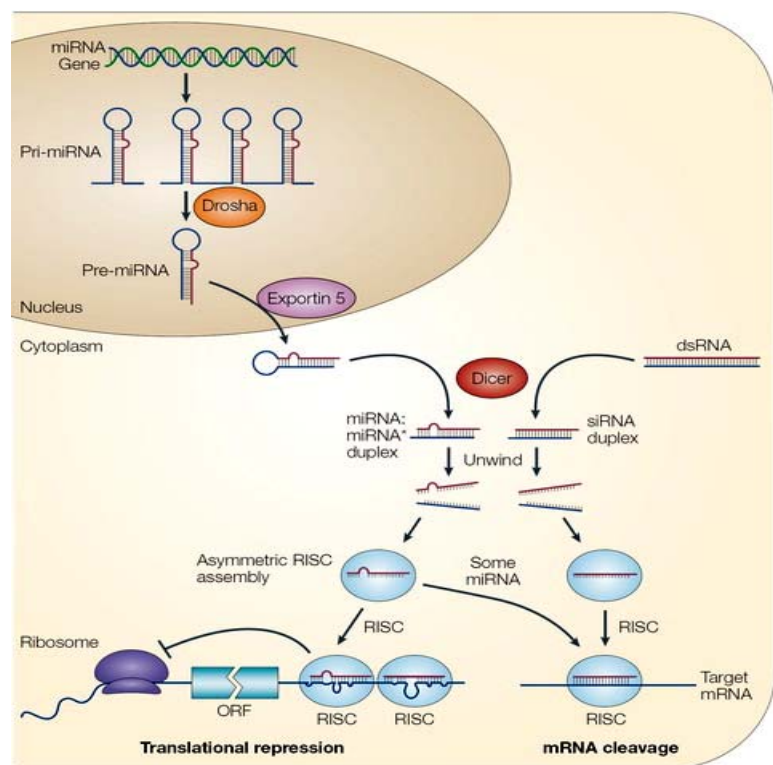


Figura 18. Via de la biogènesi dels miRNA en cèl·lules eucariòtes.

Gràcies al seu descobriment i a la importància de la seva funció, s'han generat varies tècniques moleculars per utilitzar els microRNAs en la investigació. En el nostre cas, la utilització d'adenovirus que codifiqués per miRNAs, per així obtenir el model *knock-down*. No tots els virus poden codificar per miRNAs degut a la seva via biogènica, com els virus de RNA i la família de virus de DNA citoplasmàtic. Els virus usats en aquest camp són l'Herpesvirus, el Polyomavirus, l'Adenovirus i l'HIV (Qi et al., 2006). Els adenovirus codifiquen per un RNA no codificant de ~160 nt, anomenat RNA associat a virus (VA RNAs), el qual és incorporat a la via dels miRNAs endògens.

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode de generació d'Adenovirus d'Invitrogen (*Vira-power adenoviral expression system*) (apartat 2.1.9) que codifiquen miRNAs obtinguts mitjançant el kit de

Block-it miR RNA, d'Invitrogen. Els miRNAs es dissenyen *on-line* a la pàgina de *Block-it miR RNA designer* d'Invitrogen. S'introdueix la seqüència del cDNA i el programa dona 10 possibles miRNAs al llarg de tota la seqüència. S'estudien i, en aquest treball, se n'han triat 5 per cada proteïna. Els oligonucleòtids arriben com a DNA de cadena simple, una seqüència *top* i una altre *bottom* per cada miRNA (aquí només s'ha exemplificat la seqüència *top*, ja que la *bottom* és la complementaria):

Scramble (SCR): El miRNA SCR està dissenyat de manera aleatòria perquè no s'uneixi a cap DNA conegut i serveixi com a control.

5'- tgctg aaatgtactgcgcgtggagac gtttggccactgactgac gtctccacgcagtacattt cagg
 5' miRNA antisense loop miRNA sense 3'

miRNAs de MLC1 de rata: els miRNAs estan dissenyats contra el cDNA de MLC1 de rata. El 344 i el 2088 són miRNAs de les zones UTRs 5' i 3' no codificants respectivament, el 756, 889 i 905 són de la zona codificant:

miRNA 344

5'- tgctg tcaatgaggagattaagggag gtttggccactgactgac ctcccttactcctcattga cagg

miRNA 756

5'- tgctg tgcacagcgcgaaataatccat gtttggccactgactgac atggattatgcgctgtgca cagg

miRNA 889

5'- tgctg atccaaaccagattaagcacg gtttggccactgactgac cgtgcttactggttggat cagg

miRNA 905

5'- tgctg ttcaggatcaatttgcaccca gtttggccactgactgac tggatgcattgatcctgaa cagg

miRNA 2088

5'- tgctg aaaggacccaacttactatag gtttggccactgactgac ctatagtattgggtccttt cagg

Els miRNAs es clonen via *gateway* en el pENTR-GFP per generar l'*entry clone* que després és recombinada amb el pAdV-CMV/V5 per produir els virus. Els pri-miRNA estan basats en la seqüència murina del miR-155 (Lagos-Quintana et al., 2002) amb les regions 5' i 3' pel clonatge direccional i un *loop* terminal, que ajuda a formar l'estructura. Aquest casset es clona en el vector que porta la EmGFP (*Emerald Green Fluorescent Protein*):



Procediment:

- Es resuspenen els miRNAs amb aigua Milli-Q a una concentració final de 200 μM i es procedeix a l'anellament dels dos oligonucleòtids per tal d'obtenir el miRNA de doble cadena (ds miRNA) a 50 μM.

Reacció d'anellament:	(200 μM) top oligonucleòtid	5 μl
	(200 μM) bottom oligonucleòtid	5 μl
	10x tampó d'anellament	2 μl
	aigua DNase/RNase-free	8 μl
	volum total	20 μl

2. S'incuba durant 4 min a 95°C. Es deixa atemperar a temperatura ambient 10 min, es barreja i es fa un *spin*. Es fan unes dilucions seriades per tal d'obtenir el miRNA a 10 nM. Per això, primer es fa una 1:100 amb aigua lliure de DNase/RNase (obtenint una concentració de 500 nM) i seguidament, una dilució 1:50 amb el tampó d'anellament (1 µl 500 nM ds miRNA + 5 µl 10x tampó + 44 µl d'aigua lliure de DNase/RNase) per tal de tenir el ds miRNA a 10 nM.
3. Es digereix el pENTR-boicot (pDONR-221 modificat, s'hi ha introduït la EmGFP i una diana *Bsa I* on es clona el ds miRNA) amb l'enzim *Bsa I* a 50°C 1 h i es purifica amb el kit de Roche. Es quantifica i es dilueix amb aigua lliure de DNase/RNase fins a una concentració de 5 ng/µl.
4. Es lliguen els ds miRNAs amb el vector digerit amb la següent reacció de lligació:

(5 ng/µl) pENTR-boicot dig.	2 µl
(10 nM) ds miRNA	4 µl
5x tampó lligació	4 µl
aigua DNase/RNase-free	9 µl
(1 U/µl) T4 lligasa	<u>1 µl</u>
volum total	20 µl

S'incuba durant 5 min a temperatura ambient i es posa en gel.

5. Es transforma 2 µl de la lligació a les bacteries DH5α per electroporació i es sembren en LB kanamicina. S'extreu el DNA (*entry clone*) de les colònies i es seqüencia.
6. Un cop verificat l'*entry clone* es procedeix a la recombinació LR amb el vector destí, que en aquest treball els miRNAs s'han clonat al vector de destí pAdV-CMV/V5, el qual ens permetrà generar els adenovirus.

Per tal de tenir més eines, sobretot per fer els experiments d'imatge amb calceina, fura-2 o amb el sensor de Cl⁻ YFP (que tenen fluorescència verd-groc), també es van clonar els miRNAs SCR i 905 de MLC1 amb la proteïna *cherry* que té fluorescència vermella. El clonatge es va fer via *gateway multisite* de 2 fragments: un fragment amplificat per PCR que conté el miRNA amb les seqüències *attB1-attB5r* i clonat per generar l'*entry clone attL1-attL2* i l'*entry clone* que conté la *cherry* clonada *attL5-attL2*. Aquest dos fragments es recombinen per la reacció LR amb el vector destí pDEST-CMV/V5.

1.2. BACTERIES, ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA

1.2.1. Tipus de soques bacterianes

DH5α	(F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-)
BL21	(F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
DH10B	(F± mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D(ara,leu)7697 galU galK l± rpsL nupG)

1.2.2. Obtenció de bacteries electrocompetents d'alta eficiència

L'electroporació és una tècnica de transformació de bacteris que es basa en una descàrrega elèctrica per obrir porus en la paret bacteriana que permetran l'entrada de DNA exògen. És necessari que el DNA a transformar estigui lliure de sals, ja que interfereixen en l'eficiència del procés. És un mètode que dona una alta eficiència de transformació (de l'ordre de 10^9 TU/ μ g).

Materials i reactius

- Estoc de glicerol de les bacteries *E. Coli* (soques DH5 α , BL21).
- Medi LB, antibiòtics.
- Glicerol 10% (v/v) en aigua, autoclavat, 4°C.
- Tubs de centrifuga de 500ml autoclavats, 4°C.

Metodologia

El protocol es realitza tot sota flama.

1. Es raspa el glicerol de bacteris en 5 ml de LB sense o amb l'antibiòtic corresponent, i es deixa créixer a 37 °C en agitació durant 12-16 h.
2. Es dilueix el precultiu 1:100 en 500 ml de LB i s'incuba a 37°C en agitació fins arribar a una DO a 600 nm de 0.5-0.6.
3. S'atura el creixement bacterià incubant el cultiu 20 min en gel. (A partir d'aquí, tots els passos es realitzen a 4°C). Les bacteries es transfereixen als tubs per la centrifuga i es centrifuguen a 4000 g durant 15 min a 4°C. S'elimina el sobrenedant per decantació i es resuspèn en 500 ml d'aigua glicerol 10%. S'homogeneïtza i es centrifuga a 4000 g durant 15 min a 4°C. Seguidament es decanta el sobrenedant.
4. Es repeteix el pas 3 dos cops, però resuspènent el pèl·let en un volum de 250 ml.
5. Després de decantar el sobrenedant, es resuspèn el pèl·let en un volum final de 2 ml de glicerol 10% en aigua.
6. Finalment, es procedeix a al·lquotar la mostra en al·lquotetes de 50 μ l, congelant-les tot seguit en nitrogen líquid. Les al·lquotetes es guarden a -80°C.

1.2.3. Transformació de bacteries per electroporació, amplificació de DNA

S'afegeixen 0.5-1 μ l del DNA a transformar en una al·lquota de 50 μ l de les bacteries electrocompetents, mantenint-ho sempre en gel. Després d'homogeneïtzar-ho, es transfereix a una cubeta d'electroporació de 0,1 cm (BioRad), la qual s'ha mantingut també en fred. A continuació se li aplica una descàrrega elèctrica de 375 V mitjançant un electroporador (BioRad Micropulser, en programa "Ec 1"). L'aparell ens dona un valor en milisegons del temps que ha estat la mostra sotmesa al corrent. Com més gran sigui aquest temps, més eficient serà la transformació. Tot seguit, es rescata la mostra afegint-hi 0,5 ml de LB sense antibiòtic i passant-ho a un tub eppendorf. A continuació es fa créixer la mostra a 37°C en agitació durant 1h i es procedeix a la sembra en LB-Agar amb l'antibiòtic corresponent al DNA transformat. Posteriorment s'aïllaran i amplificaran varies colònies, per purificar i validar el DNA plasmídic

1.3. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DEL DNA PLASMÍDIC

1.3.1. Obtenció del DNA

Per obtenir el DNA amplificat, s'utilitza el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep kit* de Qiagen, segons el protocol del fabricant. Depenent del volum del cultiu, es poden extreure petites quantitats de DNA utilitzant les mini-preparacions (0,4-0,5 µg/µl) o grans quantitats en el cas de les maxi-preparacions (1-2 µg/µl), però tots dos es basen en el mateix principi: llisi alcalina de les bacteries amb una posterior unió del DNA a una resina d'intercanvi iònic, sota condicions de salinitat i pH adequats. Es netegen les impureses (lípid, proteïnes, DNA genòmic i RNA) del DNA, unit a la reïna, amb una solució de baixa salinitat i etanol, finalment eluït en aigua milliQ.

1.3.1.1. Maxipreparacions de DNA dels BACs

Com que els BACs es comporten com cromosomes, l'amplificació d'aquests es fa en soques d'*E.coli* DH10B. Els vectors que formen els BACs són vectors d'una o dues còpies per cèl·lula, i per tant, per obtenir la quantitat necessària de DNA, es requereix un volum del cultiu de partida molt gran. També s'ha de tenir en compte que, degut a la mida dels vectors, l'obtenció del DNA s'ha de fer pel mètode de la llisi alcalina tradicional, utilitzant lisozima.

Materials i reactius

- Medi LB i plaques de LB Agar.
- Cloramfenicol (50 mg/ml) i plaques LB-Cloramfenicol (30 µg/ml)
- Solució de lisozima (500 ml): 4.5 g glucosa, 10 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, 112.5 ml 1 M Tris.HCl, en aigua milliQ, pH 8.0, i abans d'utilitzar, afegir 2 mg/ml de lisozima i 100 µg/ml de RNasa A.
- Solució NaOH-SDS (200 ml): 10 ml 4 N NaOH, 10 ml 20% SDS en aigua milliQ.
- Solució KOAc (500 ml): 147 g acetat de potassi 142.5 ml àcid acètic glacial, pH entre 4.8 i 5.3.
- Solució SDS 10%: 50g SDS en 400ml aigua mQ, escalfar a 68°C per dissoldre, ajustar el pH a 7.2.
- RNasa A (10mg/ml en NaOAc pH 5.2, 15min a 100°C (per inactivar la DNasa), ajustar el pH a 7.4 amb 1M Tris pH 7.4
- EDTA 0.5M
- NaOAc 3M, pH a 5.2 o 7 amb àcid acètic.
- SOC (appendix 5)
- TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Procediment

1. Inocular una colònia de DH10B que contingui el BAC en 5 ml de LB amb cloramfenicol (12,5 µg/ml), i deixar créixer el cultiu a 37°C durant tota la nit, amb agitació.
2. Inocular els 5 ml del cultiu en 1 l de LB més cloramfenicol i incubar el cultiu a 37°C durant tota la nit amb agitació.
3. Passar el contingut a tubs de centrifuga i centrifugar a 10000g durant 10 min, descartar sobrenedant.

4. Resuspèn el pèl·let amb 20 ml de la solució de lisozima i incubar-ho 5 min en gel.
5. Afegir 40 ml de NaOH-SDS, barrejar i incubar 5 min en gel.
6. Afegir 30 ml de la solució de KOAc freda i barrejar. Es forma un precipitat blanc. La barreja es congela a -80°C fins que està completament gelada (~30 min).
7. Es centrifuga a 15000g durant 15 min i es filtren els sobrenedants a nous tubs. S'afegeix el mateix volum d'isopropanol per tal de precipitar el DNA i es congela com en el pas 6.
8. Es centrifuga a 15000g durant 30 min per pel·letejar el DNA, es descarta el sobrenedant i es renta el pèl·let amb 50 ml d'etanol al 70%.
9. Es centrifuga a 15000g durant 15 min, es descarta l'etanol i es deixa assecar. Es dissol el precipitat de DNA amb 1 ml de TE. Es combinen tots els DNAs dels diferents tubs en un tub de 15 ml.
10. Afegir la RNAsa a 20 mg/ml i s'incuba a 37°C durant 45 min per tal d'eliminar el RNA del DNA.
11. Extreure el DNA amb un volum igual de fenol, centrifugar a 6000g 5 min, i treure la fase superior aquosa corresponent al DNA. Afegir el mateix volum de 25:24:1 fenol:cloroform: isoamil alcohol, centrifugar 2 min a 6000g.
12. Posar la fase aquosa en un eppendorf de 2ml. Precipitar el DNA afegint 1/10 del volum de NaOAc i 2 volums d'etanol, centrifugar a 13000 rpm, assecar i resuspèn amb 200 μl d'aigua.

1.3.2. Precipitació del DNA

El procés de precipitació del DNA s'utilitza tant per purificar el DNA com per concentrar-lo. A la mostra de DNA s'hi afegeix 3 cops el volum d'etanol 95% o isopropanol (també s'hi pot afegir 1/10 d'acetat de sodi 3M) i es posa 30 min a -80°C per afavorir la precipitació. Es centrifuga a 13,300 rpm 30 min, es fan 3 rentats amb etanol al 70%, centrifugant 5 min, i es deixa assecar el pèl·let. Es resuspèn el DNA amb aigua Milli-Q.

1.3.3. Quantificació del DNA

Els àcid nucleïcs tenen un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet la seva quantificació i validació del grau de puresa. Mitjançant un espectrofotòmetre es realitza un perfil d'absorbància entre 220 i 320 nm, per tal de validar la puresa de la mostra. El DNA o RNA purificats presenten una corba típica, amb el seu màxim a 260 nm, punt que es mesura per extrapolar la concentració de la mostra.

La mostra de DNA (1-2 μl) es passa per l'espectrofotòmetre (Nano-Drop) que et dóna l'absorbància a 260 nm que correspon a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA o 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA i la concentració en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La fórmula a aplicar es la següent:

$$C = \text{ABS}_{260} \times 50 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times \text{FD} \text{ (Per DNA)}$$
$$C = \text{ABS}_{260} \times 40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l} \times \text{FD} \text{ (Per RNA)}$$

on C és la concentració, ABS l'absorbància i FD el factor de dilució.

1.3.4. Seqüenciació

El darrer pas per verificar la construcció obtinguda és la seqüenciació de la seqüència nucleotídica de la construcció. Es basa en el mètode descrit per Sanger et al. (1977). Durant aquest treball s'utilitzà el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* i l'analitzador ABI3730 de la casa comercial Applied Biosystems.

Materials i reactius

- Termociclador.
- Seqüenciador ABI3730.
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit i tampó corresponent.
- DNA a seqüenciar.
- Encebador corresponent per a la zona a seqüenciar, concentració 1 µM.

Metodologia

1. En un tub es barregen 0.5-1 µg de DNA, 1 µl de BigDye, 1 µl de tampó de BigDye, 3 µl d'encebador, i aigua milliQ fins a un volum final de 10 µl. La BigDye cal afegir-la en l'últim pas.
2. La reacció de PCR s'efectua en les condicions següents en el termociclador:

desnaturalització a 96°C	10s	}	25 cicles
hibridació a 50°C	5s		
elongació a 60°C	4min		
3. Finalitzada la reacció de PCR, s'afegeixen 10 µl d'aigua Milli-Q i s'envia a seqüenciar als Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona.

1.4. OBTENCIÓ DEL RNA, RT- qPCR I MICROARRAYS

A continuació es resumeixen les dades d'obtenció de RNA, RT-qPCR i *microarrays* ja que aquestes tècniques es van fer en col·laboració amb el Dr. Miguel López de Heredia (IDIBELL).

1.4.1. Obtenció del RNA

L'extracció del RNA missatger es fa mitjançant el kit *Total RNA and Protein Isolation* (Macherey-Nagel) segons el protocol del fabricant, a partir d'un cultiu d'astròcits control i infectats amb Adenovirus miRNA SCR, 756 i 905. S'obtenen quantitats de RNA de 2-3 µg, quantificat amb el Nanodrop.

La qualitat dels mRNAs extrets es mesura utilitzant els xips d'Agilent RNA 6000 Nano, segons el protocol de fabricant. Aquest mètode dona un valor RIN que va de l'1 al 10 en funció de la qualitat del RNA (1, baixa qualitat; 10, alta qualitat). Es recomana utilitzar els RNAs amb RIN superior a 7 per obtenir uns bons *microarrays*.

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

La tècnica de RT-qPCR és una combinació de dues tècniques que permet amplificar i quantificar simultàniament el RNA missatger. Les tècniques són: (i) la transcripció inversa del RNA de cadena

simple per obtenir el DNA complementari (cDNA), mitjançant una transcriptasa inversa, el qual és amplificat per PCR; i (ii) la PCR quantitativa o *real time*-PCR, la qual permet quantificar el cDNA en temps real utilitzant marcadors fluorescents que s'intercalen amb el DNA, o sondes específiques per detectar un cDNA en concret (VanGuilder et al., 2008). El mRNA extret (0,8-1 µg), es transcriu inversament mitjançant el kit *Transcriptor First Strand RNA* (Roche), seguint les instruccions del fabricant a 50°C durant 30 min amb encebadors hexàmers a l'atzar. La qPCR es realitza utilitzant el kit *Lightcycler 480 probes master* (Roche) seguint les instruccions del fabricant, amb un volum final de 10 µl, utilitzant la tecnologia UPL (*universal probe library*, Roche). Aquesta tècnica combina els assajos amb SYBR Green I amb l'especificitat dels assajos amb sondes específiques. Com a encebadors es van utilitzar els oligonucleòtids i les sondes indicats a continuació, dissenyats a través de la pàgina https://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/upl-/index.jsp?id=uplct_000000

Gen	ID del RNA de Referència	OligoF	Seqüència OligoF	OligoR	Seqüència OligoR	Número Sonda (UPL)	Mida Ampliçón	Posició sonda (en el mRNA)
Actb	NM_031144.2	VNOL-134	cccgcgagtacaacctct	VNOL-135	cgatcatcatggcgaact	17	72	38
Irf9	NM_001012041.1	VNOL-470	aggacccagtggtcatgga	VNOL-471	ggtgagcagcagcagtagt	69	62	682
Mlc1	NM_001108105.1	VNOL-138	cctgaatccttcagccataaa	VNOL-139	catgaggagctccaacagc	15	67	958
Slc12a2	NM_031798.1	VNOL-445	cacgatgagctggaaaagg	VNOL-446	tcggcagtgatgtgacca	126	95	902

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

Subprograma	Número de cicles	Tipus d'anàlisi
Desnaturalització	1	
Amplificació	55	Quantificació
Anellament	1	Compensació de color
Refrigeració	1	

Cada subprograma constava dels següents passos:

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

L'expressió dels gens es normalitza per l'actina (ACTB) utilitzant corbes d'eficiència específiques per cadascun d'ells, tant en les reaccions simples com en les múltiples. L'anàlisi de les dades

obtingudes de la qPCR es tracten amb el software LightCycler 488 SW 1.5 de Roche, posteriorment es corregeixen els valors RIN utilitzant l'algoritme proposat per Ho-Pun-Cheung (Ho-Pun-Cheung et al., 2009). L'anàlisi per RT-qPCR compleix tots els estàndards MIQE (Bustin et al., 2009).

1.4.3. Microarrays

Els *microarrays* del RNA es van fer amb la companyia ImaGenes GmbH (Berlin). Les mostres de RNA procedents dels astròcits infectats amb els AdVs miRNA SCR, 756 i 905 (per quadruplicat), van ser hibridades en arrays GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array d'Affimetrix.

2. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES

2.1 OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL

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

La solubilització de les proteïnes pot ser en condicions desnaturalitzant, amb detergents iònics, trencant tota unió covalent (SDS) o no desnaturalitzant, amb detergents no iònics, mantenint les diferents unions no covalents (Tritó X-100, Tween-20, digitonina).

La solubilització d'extractes cel·lulars es fa en fred per evitar la desnaturalització de les proteïnes. Es pot fer directament a la placa de cultiu o en un pèl·let cel·lular. En el primer cas, les cèl·lules es renten amb PBS i s'afageix el tampó de llisi (a 4°C) sobre la placa en gel (en general, 50 µl per una multipou de 6 i 0,5-1 ml per una placa de 100 mm). En el segon cas, les cèl·lules són tripzinitzades i centrifugades, i el pèl·let es pot llisar o es pot guardar a -20°C. ^{(1) (**)} El tampó de llisi generalment s'utilitza PBS 1x, 1% Tritó X-100, més inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1mM, Leupeptina i Pepstatina a 2 µM), incubant la mostra durant 1h a 4°C a l'orbital. Posteriorment, es centrifuga la mostra a 13,300 rpm durant 30 min a 4°C i s'agafa el sobrenedant. Aquest es valora per BCA.

La solubilització de teixit es fa de manera similar. Les mostres tissulars es conserven a -80°C i s'han de processar amb neu carbònica. Es talla un tros del teixit amb un bisturí i es posa en tampó de llisi amb un volum 3 cops superior al teixit. S'homogenitza amb un *micropistille* (eppendorf) i es segueix el mateix protocol anterior ⁽¹⁾.

^(**) En alguns casos, com quan es necessiten els extractes proteics per fer immunoprecipitació, s'utilitzen altres detergents més suaus com el n-Decyl-β-D-maltopyranoside (DM), n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) i Fos-choline (Anatrace) o complexolyte 47 de composició desconeguda, ja que és propietat de l'empresa Logopharm.

2.1.2. Obtenció de membranes totals a partir de teixit

Per realitzar els experiments d'immunoprecipitació, s'utilitzen les mostres de teixit nerviós, principalment cervell de rata o ratolí, o cervell humà, per extreure les membranes totals i així enriquir la fracció de proteïnes de membrana (Camps *et al.*, 1992).

Materials i reactius

- Tampó d'homogeneïtzació: PBS1x Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, Sacarosa 250 mM, pH 7.4.
- Inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1mM, Leupeptina i Pepstatina a 2 µM).
- Politró.
- Teixit 0.5-1 g.
- Tub d'ultracentrifuga, rotor i ultracentrifuga.
- Bradford.

Procediment

1. S'agafa una alíquota d'uns 10 ml de tampó d'homogeneïtzació i s'hi afegeixen els inhibidors de proteases, en gel.
2. S'introdueix el troç de cervell en un tub d'assaig de 15 ml, i a continuació s'hi afegeixen 8 ml de tampó de homogeneïtzació fred més els inhibidors.
3. Es procedeix a homogeneïtzar el teixit amb el politró, a intervals de 10-15s a màxima potència i cal mantenir-ho sempre en gel.
4. Es centrifuga l'homogenat a 5,000 g durant 5min a 4 °C.
5. A continuació, es recull el sobrenedant i es diposita en un tub d'ultracentrifuga, que es centrifuga a 150,000 g durant 90 min a 4 °C (s'utilitza el rotor TLA 120.1 de Beckman Coulter).
6. Es descarta tot el sobrenedant amb cura, i es resuspèn el pèl·let amb 100-500 µl de tampó d'homogeneïtzació amb inhibidors, primer amb pipeta i després amb una xeringa d'insulina fins que l'homogeneïtzació de la mostra sigui total.
7. Finalment, es valora la concentració proteica pel mètode Bradford, es fan alíquotes i es congela a -80 °C .

2.1.3. Determinació de la concentració proteica

La determinació de la concentració proteica de mostres en solució es realitza per dos mètodes diferents:

1) Mètode de Bradford et al. (1976)

Aquest mètode es basa en les propietats del colorant blau de Coomassie G-250. Aquest colorant, en unir-se a les proteïnes el seu màxim d'absorció es veu desplaçat de 465 a 595 nm. L'absorbància a 595 nm serveix de magnitud de mesura de la concentració proteica. Aquest mètode és incompatible amb mostres que continguin detergents.

Materials i reactius:

- Placa ELISA de 96 pous.
- Lector ELISA (Biotek)

- Solució comercial BioRad Protein Assay (Coomassie blau brillant G-250, àcid fosfòric i metanol), diluïda 1/4 en aigua destil·lada.
- Solució de BSA (albúmina bovina) a 2 mg/ml en aigua milli-Q.

Metodologia

1. Es prepara la quantitat necessària de reactiu Bradford diluïda 1/4 en aigua destil·lada pels punts de la recta patró, així com per les mostres, tenint amb compte que es realitzen duplicats per a cadascuna d'elles, i que es necessiten 200 µl per pou.
2. A la placa d'ELISA s'inoculen els diferents punts de la recta patró: 0, 0.5, 1 i 2 mg de proteïna (BSA) en un volum final de 10 µl d'aigua Milli-Q, i seguidament, 1 µl de cada mostra en 9 µl d'aigua (si la mostra està molt concentrada, es fa una dilució 1/10 i, si és necessari, una 1/100).
3. S'afegeixen 200 µl de reactiu Bradford diluït. Posteriorment, s'agita la placa i es mesura en un lector d'ELISA a una absorbància de 595 nm.

2) Mètode de BCA (Pierce)

És convenient valorar les mostres solubilitzades amb detergent pel mètode de BCA (àcid bicinconínic). Aquest mètode es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir el Cu^{+2} . Els ions Cu^{+2} produïts s'uneixen a dues molècules de BCA produint un canvi estructural de la molècula, fet que provoca que aquesta absorbeixi llum a 562 nm, formant un compost de color porpra. La concentració de proteïna present és proporcional a l'absorció del compost. No són compatibles amb aquest mètode mostres que continguin més de 100 mM de EDTA, 1 mM DTT o 20% de NH_3SO_4 .

Materials i reactius:

- Placa ELISA de 96 pous.
- Lector ELISA (Biotek).
- Solució comercial (Pierce): Reactiu A (BCA, en condicions alcalines) i Reactiu B (4% de sulfat de coure). La barreja s'efectua amb una ràtio de 50 ml de reactiu A per cada ml de reactiu B.
- Solució d'albúmina bovina (BSA) (2 mg/ml).

Metodologia

El mètode es realitza de manera similar al Bradford. Es fa la recta patró per duplicat, igual que les mostres. S'hi afegeixen 200 µl per pou del reactiu de BCA 1:50 i es deixa reaccionar amb les mostres 30 min a 37°C. Posteriorment, es procedeix a la lectura mitjançant el lector d'ELISA a 595 nm.

2.2. Tècnica de Western-Blot (WB)

El Western-Blot és una tècnica àmpliament utilitzada en biologia molecular la qual permet la detecció específica de proteïnes a partir de mostres biològiques. Aquesta tècnica aporta informació sobre la mida de les proteïnes, així com d'algunes característiques bioquímiques

(oligomerització, fosforilació, glicosilació o altres característiques que influeixen la migració electroforètica).

La tècnica consta de tres etapes:

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

1) Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi en gels desnaturalitzadors d'acrilamida-SDS (Laemmli, 1970) és un sistema clàssic de separació de proteïnes en funció del seu pes molecular. El mètode es basa en què les proteïnes contingudes en una solució de SDS (detergent aniònic) són capaces de migrar sota un camp elèctric. L'SDS confereix a les proteïnes càrrega negativa, mantenint la relació càrrega/massa, que permet la seva separació en migrar sobre una malla de polímer (acrilamida/bisacrilamida) en aplicar un camp elèctric.

El gel de poliacrilamida consta de dues parts: un gel concentrador que permet alinear les proteïnes prèviament a la separació electroforètica, i un gel separador. La concentració de acrilamida/bisacrilamida del gel separador varia segons el pes de la proteïna a detectar, oscil·lant entre un 7.5 i un 15%. Juntament amb les mostres problemes, es fan migrar els estàndards proteics de pes molecular conegut i pretenyits com a marcadors.

Materials i reactius

- Sistema de Western-Blot Mini-Protean de BioRad.
- Font de corrent elèctrica.
- Pipeta Hamilton de 50 µl.
- Tampó d'electroforesi 1x (veure apèndix).
- Tampó de càrrega LSB 4x (veure apèndix).
- Solució gel separador (1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS).
- Solució gel concentrador (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS).
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37,5:1) (bioRad).
- APS (Persulfat d'amoni 10% en aigua).
- TEMED .
- Blau de Coomassie (Àcid acètic 7,5% (v/v), isopropanol 25% (v/v), Blau brillant R (Sigma) 0,05% (v/v)).
- Solució destenyidora (Àcid acètic 7,5% (v/v), isopropanol 7,5% (v/v)).

Metodologia

1. Preparació de les mostres. En un tub eppendorf es prepara la quantitat de proteïna desitjada, en gel, més el tampó de càrrega LSB que quedi finalment a 1x. S'escalfen en un termo-agitador, i la temperatura dependrà del tipus de proteïna a immunodetectar. Per proteïnes de

membrana, les mostres es processen a 60°C 2 min per tal que no formin agregats. Per a proteïnes citosòliques, les mostres es processen a 95°C durant 5 min.

- Muntatge i polimerització del gel de poliacrilamida. Prèviament al muntatge i polimerització del gel, convé rentar els vidres amb etanol. Es munten el vidres en el suport de muntatge i es procedeix a barrejar els reactius del gel separador, afegint-hi el TEMED i l'APS en darrer lloc. A la taula següent es descriuen les relacions pels diferents percentatges dels gels d'acrilamida.

SEPARADOR (x2gels 1.5mm, 20ml)	7,5%	10%	12%	15%	CONCENTRADOR (x2gels 1.5mm, 10ml)	4%
Acrilamida 40%	3,8ml	5ml	6ml	7,5ml	Acrilamida 40%	1ml
Sol. separació	5,2ml	5,2ml	5,2ml	5,2ml	Sol. concentració	2,5ml
AIGUA	11ml	9,8ml	8,8ml	7,3ml	AIGUA	6,5ml
TEMED	20ul	20ul	20ul	20ul	TEMED	20ul
APS	200ul	200ul	200ul	200ul	APS	200ul

S'introdueix la barreja entre els vidres, de manera que ocupi 3/4 parts i s'hi afegeix isopropanol a la part superior del gel abans que aquest polimeritzi, d'aquesta manera el límit superior del gel queda recta. Una vegada polimeritzat el gel separador, es decanta l'isopropanol, es renta amb aigua i s'hi diposita el gel separador. Abans que aquest polimeritzi, es col·loca la pinta de 10 o 15 pous, segons el número de mostres a córrer. A continuació es munten els vidres amb el gel polimeritzat en el sistema electroforètic i s'omple amb tampó d'electroforesi de manera que hi hagi una continuïtat elèctrica.

- Migració del gel. S'extreu la pinta i es procedeix a carregar les mostres mitjançant una pipeta Hamilton de 50 µl. Es tanca el circuit amb la tapa amb la disposició dels pols dels elèctrodes corresponents, i es connecta a una font d'alimentació a un voltatge constant de 100-150 V fins que el marcador de proteïnes s'hagi separat suficientment per poder detectar la proteïna d'interès.
- Tinció de Coomassie: La tinció de gels ens permet veure el patró de bandes corresponents a les proteïnes (Merril CR, 1990) i ens serveix, en aquest treball, per veure l'expressió de proteïnes de fusió. Es submergeix el gel en la solució de coomassie durant 1h, en agitació. Es destenyeix rentant el gel en la solució destenyedora, fent canvis cada 20 min. en agitació i, si és necessari, es fa un rentat durant tota la nit.

2) Transferència

Una vegada finalitzada la separació electroforètica, les proteïnes són electrotransferides a una membrana porosa de fluorur de polivinilidè (PVDF) de manera que quedin immobilitzades, permetent la seva immunodetecció.

Materials i reactius

- Sistema de Western-Blot MiniProtean de BioRad (cassets i esponges de transferència, cubeta)
- Paper Whatmann 3MM.

- Membrana Immobilon-P (Millipore).
- Tampó de transferència 1x més el 20% (v/v) de metanol (veure apèndix)

Metodologia

1. Primer, es procedeix a hidratar i activar la membrana de manera que sigui receptiva a immobilitzar proteïnes: es submergeix la membrana, prèviament tallada amb la mida aproximada del gel, en metanol durant 5 min, a continuació en aigua destil·lada uns altres 5 min. Finalment, es deixa equilibrar en el tampó de transferència.
2. Muntatge del sandwich de transferència: una cubeta de plàstic s'omple amb tampó de transferència, es col·loca el casset amb el costat negre cap a baix; s'hi col·loca una esponja, paper Whatmann i el gel separador (el qual ha estat separat del concentrador) en aquest ordre. A continuació, es col·loca la membrana de manera que no es formin bombolles entre el gel i la membrana. La formació de bombolles impedeix la transferència proteica. A sobre la membrana s'hi col·loca altre cop paper Whatmann i una esponja, i es procedeix a tancar el sandwich. Aquesta disposició permet un flux del tampó seguint el camp elèctric, des del gel cap a la membrana, transferint-hi les proteïnes immobilitzades en el gel.
3. Es col·loca el casset en la cubeta de transferència prèviament omplerta amb tampó de transferència, de manera que el costat negre coincideixi amb el pol negatiu dels elèctrodes. També s'hi diposita una placa de gel per evitar el sobreescalfament del sistema. Els temps de transferència depenen de la mida de la proteïna, generalment 90 min a 250 mA per assegurar la transferència i per proteïnes d'alt pes molecular, fins a 2h, o tota la nit a 35 V en fred.

3) Immunodetecció

Una vegada realitzada la transferència es procedeix a la detecció de la proteïna d'estudi, immobilitzada sobre la membrana, mitjançant anticossos específics. En aquest treball s'han realitzat Western-Blots contra diferents proteïnes utilitzant anticossos policlonals i monoclonals que es descriuran en cada apartat de resultats.

Materials i reactius

- Solució de bloqueig. (5% de llet desnatada en pols en TBS 1x, 0,1% Tritó X-100, o 5% BSA en TTBS).
- Anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig.
- Anticossos secundaris. (Diluïts 1/10,000 en solució de bloqueig. Aquests anticossos es troben conjugats amb peroxidasa de rave (HRP)).
- Solució de rentat TTBS (TBS 1x, 0.1% Tritó X-100).
- Reactiu ECL (apèndix).
- Hyperfilms (Amersham) i casset de revelat.
- Ponceau (Àcid acètic 5% (v/v), ponceau 0,1% en aigua)
- Solució d'estripat (62.5mM tris-HCl pH 6.5, 2% SDS, 0.7% β -mercaptoetanol en aigua milliQ)

Metodologia

1. Les membranes de la transferència són dipositades en una cubeta amb el ponceau que tenirà les proteïnes, així es pot comprovar que la transferència ha funcionat bé i s'observa si hi ha bombolles. Es destenyeix amb la mateixa solució de transferència.
2. Bloqueig de la membrana: Per tal d'evitar interaccions inespecífiques de l'anticòs amb altres proteïnes, cal bloquejar la membrana abans de la incubació amb l'anticòs primari. Les membranes es preincuben amb la solució de bloqueig (rica amb proteïnes i baixa en grasses), 1h en agitació constant, a temperatura ambient.
3. Incubació amb l'anticòs primari: L'anticòs primari es dilueix en solució de bloqueig per tal que s'estableixi certa competència entre les proteïnes de la llet o la BSA i l'anticòs, forçant les unions específiques. La incubació es realitza en una caixeta o en una bossa de plàstic Glad termosegellada, on s'hi introdueix la membrana i de 3 a 5 ml d'anticòs diluït en solució de bloqueig, procurant evitar la formació de bombolles. La incubació es realitza en un agitador, durant 1 h a temperatura ambient, o bé 12-16 h a 4 °C.
4. Rentat: Per tal de retirar l'excés d'anticòs, i netejar la membrana d'unions inespecífiques, s'efectuen tres rentats de la membrana de 10 min cadascun amb solució de rentat a temperatura ambient en agitació.
5. Incubació amb anticòs secundari: Per detectar les unions específiques de l'anticòs primari amb la proteïna d'estudi, la membrana s'incuba amb anticòsos espècie-específics per a IgGs, conjugats a l'enzim peroxidasa. Això permet detectar la interacció mitjançant una reacció hidrolítica que genera llum. L'anticòs secundari es dilueix en solució de bloqueig (1:10000) i s'incuba durant 1h a temperatura ambient en agitació. Posteriorment, es renta l'excés d'anticòs, efectuant tres rentats de 10 min amb la solució de rentat.
6. Revelat: El revelat es fa incubant la membrana amb una solució que conté luminol, compost que en ser hidrolitzat per la peroxidasa, genera llum. Aquesta llum es detecta mitjançant l'exposició de la membrana sobre un film fotogràfic. S'incuba la membrana amb solució ECL durant 1 min i es retira l'excés. El revelat es fa en una cambra fosca amb l'ajuda d'un casset de revelat, efectuant exposicions a diferents temps sobre paper fotogràfic hiperfilm de major sensibilitat. Els films es revelen amb un sistema de revelat fotogràfic.
7. Estripat de la membrana: aquest procés és útil quan es vol aprofitar una membrana per incubar-la amb un altre anticòs primari que és de la mateixa espècie que el primer anticòs que ens interfereix. La solució d'estripat trenca les interaccions dels anticòsos i manté les proteïnes unides a la membrana. Després del procés de revelat, es fan 3 rentats amb TTBS de 10 min cadascun, s'incuba la membrana amb la solució d'estripat 30 min. a 50°C en agitació i es fan 3 rentats de 10 min amb la solució de rentat. La membrana està preparada per començar el procés de nou pel punt 2.

2.3. Immunocitoquímica

S'han realitzat estudis immunocitoquímics en cultius primaris d'astròcits i neurones, per tal de determinar la localització subcel·lular de MLC1 i realitzar experiments de co-localització amb diferents marcadors cel·lulars.

Les proteïnes es detecten mitjançant un mètode indirecte de immunofluorescència. S'han utilitzat anticossos secundaris anti-ratolí, anti-conill i anti-rata conjugats amb diferents fluorocroms (Alexa 488 i 568, Rhodamine-TRITC (Invitrogen i Jackson antibodies)). Els primaris utilitzats es descriuen a cada capítol de resultats. El protocol d'immunocitoquímica té 2 variants en funció dels anticossos i del tipus cel·lulars.

Materials i reactius

- Cultiu cel·lular en cubre-objectes o en *transwells*.
- Placa de cultiu de 12/24 pous.
- Pinces de cirurgia de precisió.
- Porta-objectes.
- PBS 1x estèril.
- Paraformaldehyd 3% en PBS 1x.
- Solució de bloqueig A (PBS 1x, 5% BSA).
- Solucions d'autofluorescència (PBS 1x, NH₄Cl 50 mM; i PBS 1x, Glicina 20 mM).
- Solució de permeabilització A (PBS 1x, 0,1% Tritó X-100).
- Solució de permeabilització i bloqueig B (PBS 1x, 10% FBS, 0.1% Tritó X-100).
- Solucions C (són les mateixes que les A però contenen glicina 20 mM).
- Anticossos primaris i secundaris.
- Medi de muntatge Vectashield (Vector).
- DAPI, To-PRO-3.

Procediment A

1. S'aspira el medi al cultiu i es realitzen tres rentats amb PBS.
2. Es fixen les cèl·lules amb paraformaldehyd 3% en PBS 15 min a temperatura ambient, a continuació s'aspira el paraformaldehyd i es realitzen tres rentats amb PBS. Si no es realitza l'experiment es poden guardar els cubreobjectes fixats a 4°C en PBS 1x, 0.05% azida sòdica.
3. Es dipositen els cubreobjectes en una placa estèril de 24 pous, submergits en PBS, amb la cara on hi ha les cèl·lules cap amunt. És molt important que els cubreobjectes no s'assequin.
4. Per tal d'eliminar l'autofluorescència, s'incuben les cèl·lules en solució de NH₄Cl 50 mM durant 10 min, i seguidament amb solució de glicina 20 mM, uns 10 min més.
5. A continuació, es permeabilitza la mostra amb la solució de permeabilització A durant 10 min.
6. Tot seguit s'efectua el bloqueig amb la solució de bloqueig durant 30 min.
7. Es preparen els anticossos primaris a la dilució corresponent en tampó de bloqueig; cal centrifugar-ho a 12000 rpm durant 5 min a 4°C per tal d'evitar l'agregació de les

immunoglobulines. S'incuben posant 50 µl de la dilució per a cada cubreobjectes, en un troç de parafilm, fixat sobre un superfície plana. Amb l'ajuda d'unes pinces de precisió, es col·loquen els cubreobjectes sobre les gotes, posant en contacte les cèl·lules amb solució d'anticòs. S'incuba durant 1h a temperatura ambient o 12h a 4°C dins d'una cambra humida.

8. A continuació es passen els cubreobjectes a la placa, girant-los de manera que les cèl·lules quedin a la part superior. S'efectuen 3 rentats de 10 min en PBS per tal d'eliminar l'excés d'anticòs.
9. Es prepara l'anticòs secundari marcat amb fluorocrom en la solució de bloqueig a una dilució 1/500. A partir d'aquest pas es manté la mostra sempre protegida de la llum. La mostra s'incuba 1h a temperatura ambient.
10. Es realitzen 3 rentats amb PBS de 10 min. En el cas d'efectuar marcatge de nuclis en el vermell llunyà, el segon rentat es fa amb PBS TO-PRO-3 diluït 1/1000 30 min-1h. Es fa un últim rentat.
11. Es procedeix a muntar els cubreobjectes sobre porta-objectes de vidre on s'hi afegeix una gota de vectashield (si és necessari amb DAPI (1,5 µg/ml) que emet a l'UV), girant el cubreobjectes amb l'ajuda de les pinces i dipositant-los sobre la gota, de manera que les cèl·lules es trobin en contacte amb el medi. A continuació es deixa a temperatura ambient i protegit de la llum, es treu l'excés de medi i es segella el cubre. Els portaobjectes es guarden a la nevera de 4°C protegits de la llum.

Procediment B (per als cultius primaris i la majoria d'anticossos)

Els passos 1-4 són comuns amb el procediment A.

5. Es realitza la permeabilització i el bloqueig al mateix temps amb la solució B durant 2h a temperatura ambient.
- 6-9. La dilució dels anticossos es fa en la solució B.

2.4. Obtenció d'anticossos policlonals

Es van obtenir anticossos policlonals contra diferents pèptids de la proteïna MLC1 humana. Comptant amb els serveis d'EUROGENTEC, es van immunitzar 2 conills per cada anticòs, injectant dos pèptids sintètics corresponents a la regió N-terminal de la proteïna. Els pèptids es van dissenyar per predicció en regions d'antigenicitat alta i es va comprovar que no presentessin homologia amb altres proteïnes. El pèptid N-terminal 1 (TQEPFREELAYDRMPTC), correspon als aminoàcids 2-17, i el pèptid N-terminal 2 (DPASYAPDAKPSDLQLSC), correspon als aminoàcids 24-40. Es van realitzar tres injeccions a cada animal, posteriorment es van obtenir els sèrums i es va triar quin dels 2 sèrums detectava millor la proteïna (el sèrum del conill 4734 per N4 i el 0831 per N5). Es van purificar les IgGs per afinitat amb els corresponents pèptids.

Purificació de IgGs per afinitat amb el pèptid

Els pèptids amb els quals es van immunitzar els animals van ser acoblats a una resina (SulfoLink, Pierce) que permetia la purificació dels anticossos a partir del sèrum a través d'una columna d'afinitat. Mitjançant una reacció iode-acetil, el pèptid es va unir covalentment i de forma estable a la resina. Posteriorment cal bloquejar els llocs d'unió inespecífics i incubar la columna amb el sèrum. Només els anticossos capaços de reconèixer el pèptid es van unir a la resina i, posteriorment, van ser eluïts amb una solució de pH 2,5.

Materials i reactius

- Columna cromatogràfica Bio-Rad de 10 ml.
- Resina d'acoblament Sulfolink (Pierce).
- Tampó d'acoblament 5x (Tris-HCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8.5).
- Solució de bloqueig (Cisteïna 50 mM en tampó d'acoblament 1x).
- Solució de rentat (NaCl 1M)
- Solució de manteniment (PBS, NaN₃ 1 mM)
- TBS 1x i PBS 1x.
- Tris 1M pH 9.
- Tampó de neutralització (Tris 1M, NaCl 2M, pH 8.5).
- Tampó d'elució (Glicina 100 mM, pH 2.5).
- Sèrum de conill immunitzat.

Metodologia**A) Unió del pèptid a la columna.**

1. Es prepara 1 mg de pèptid en 200 µl d'aigua milliQ i 50 µl de tampó d'acoblament 5x. Es barreja per agitació fins aconseguir una completa homogeneïtzació.
2. En la columna de cromatografia de 10 ml, s'afegeixen 1.5 ml de resina Sulfolink, i s'equilibra amb 6 volums (9 ml) de tampó d'acoblament 1x.
3. Després d'equilibrar, s'hi afegeix la solució que conté el pèptid (250 µl) i 2 ml de tampó d'acoblament 1x. S'agafa una petita alíquota (10 µl). Es tapa la columna i s'homogenitza la barreja. Es deixa incubar 2 hores agitant a l'orbital a temperatura ambient.
4. Es destapa la columna i es deixa drenar per gravetat. Del descartat es convenient agafar una alíquota per comparar-la amb la solució del pèptid inicial, mesurant l'absorbància a 280 nm.
5. S'aplica a la columna 2 ml de solució de bloqueig i s'incuba 30 min a temperatura ambient en agitació.
6. A continuació es deixa drenar el tampó de bloqueig i s'efectuen dos rentats amb NaCl 1 M. La columna ja està llesta. Pot reutilitzar-se varies vegades, guardant-la amb la solució de manteniment a 4°C.

B) Purificació de sèrum per afinitat.

1. Es prepara una dilució 1:1 de sèrum amb TBS 1x (4 ml finals). El pH de la barreja s'ha d'ajustar a pH 8 amb Tris 1M pH 9.

2. La columna, que conté el pèptid acoblat a la resina, es renta dues vegades amb TBS 1x. A continuació s'incuba el sèrum diluït durant 3h agitant en orbital a temperatura ambient.
3. Es deixa drenar, i s'efectuen dos rentats amb PBS 1x, seguit d'un rentat amb PBS 0.1x.
4. Es procedeix a eluir mitjançant glicina 100 mM pH 2.5 i es recullen 25 fraccions de 200 µl en tubs on prèviament s'hi ha afegit 20 µl de solució de Tris 1M, NaCl 2M, pH 8.5 (10x), per tal de neutralitzar el pH àcid de la mostra.

Cada fracció es va diluir 1:100 en PBS 1x, 5% llet i van ser testades per WB en extractes de cèl·lules HeLa transfectades amb MLC1 humà i en mostres de cervell humà. En aquestes mostres es van detectar 2 bandes corresponents a la MLC1 humana de 32 i 70 kDa.

Com a exemple, es mostra la purificació de l'anticòs contra MLC1 N5 descrita en el capítol 1 de resultats. En el WB de la figura 19A, es mostren els sèrums del 3er sangrat dels dos conills immunitzats amb el pèptid N5 (0381 i 0382). Com es pot observar, el conill 0381 conté les IgGs que detecten millor la proteïna MLC1 (asterisc vermell). Un cop triat el millor sèrum, es procedeix a la purificació per afinitat amb la columna que conté unit el pèptid N5 (figura 19, B). En el WB es pot observar com el sèrum pre-immune no detecta la proteïna humana MLC1, en canvi el sèrum immune 0831 sí que detecta la proteïna (bandes a ~37 i ~72 kDa). Les fraccions 1-9 contenen l'anticòs N5 eluït.

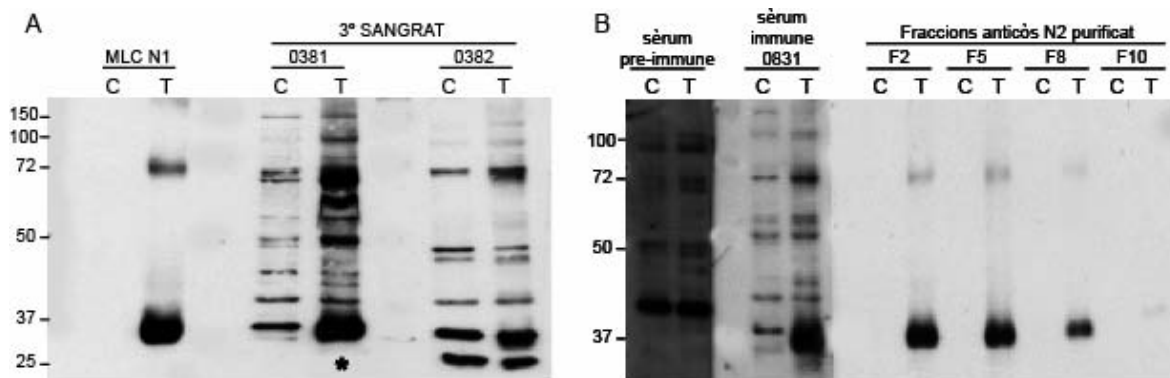


Figura 19. Purificació de l'anticòs MLC1 N5. (A) WB on es proven els dos sèrums immunes. Pel control s'usa l'anticòs N4 (prèviament purificat) en extractes de cèl·lules HeLa no transfectades (C) o transfectades que expressen la proteïna humana MLC1 (T) (25 µg proteïna). El sèrum immune del conill 0831 detecta les bandes corresponents a hMLC1 amb major intensitat que el conill 0832. (B) WB on es mostra la purificació del sèrum 0831. Es pot observar que el sèrum immune (4rt carril) està enriquit amb les IgGs contra hMLC1 en comparació al sèrum pre-immune (2n carril) en cèl·lules transfectades. Les fraccions 2, 5 i 8 contenen l'anticòs N5 contra hMLC1 purificat.

2.5. Obtenció de proteïna de fusió

Generació de les proteïnes de fusió N-terminal i C-terminal de MLC1 humà unides a His₁₀- MBP i NusA-His₁₀.

Es realitza el clonatge pel sistema Gateway obtenint els fragments de PCR de la regió N-terminal (Nt, 1-156) i de la regió C-terminal (Ct, 942-1134) amb els encebadors que contenen les regions attB1 i 2. A partir dels fragments de PCR, mitjançant la reacció BP es generen els *entry clones* que són seqüenciats per a la seva comprovació. L'Institut Sanger (Alemanya) ens va enviar una

col·lecció de vectors amb diferents *tags*, tant per fusionar proteïnes al N-terminal com al C-terminal, compatibles amb el sistema *gateway* i dissenyats per l'expressió de proteïnes en bacteris (Dyson et al., 2004). Es van generar i provar totes les possibles combinacions, però en aquest treball, només s'expliquen les construccions que van anar millor en cada cas.

Els vectors que es van utilitzar van ser, per fusionar l'extrem Nt, el pDEST-N412-MBP que conté els *tags* 10 histidines seguit de MBP (*Maltosa binding protein*, 40 kDa) i l'extrem Nt de MLC1 humà (MTQEPRFREELAYDRMPTLERGRQDPASYAPDAKPSDLQLSKRLPPCFSHKT) i per fusionar a l'extrem Ct, el pETG-60A que conté els *tags* NusA (proteïna d'*E.coli*, 55 kDa) seguit de 6 histidines i l'extrem Ct de MLC1 humà (LQAGLNTGTAIQCVRFKVSARLQGASWDTQNGPQERLAGEVARSP LKEFDKKAWRAVVVQMAQ). Es va procedir a fer les reaccions LR de l'*entry clone* Nt amb el pDES-R-N412-MBP per obtenir el vector d'expressió Nt-MBP, i de l'*entry clone* Ct amb el pETG-60A per obtenir el vector d'expressió NusA-Ct.

Materials i reactius:

- Columnnes de cromatografia (BioRad).
- Espectrofotòmetre.
- Sonicador.
- Bosses de diàlisi (Slide-A-lyzer de Pierce).
- Medi de cultiu LB, Ampicilina (100 µg/ml).
- IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside).
- Tampó de llisi (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0, 1mg/ml lisosima).
- Tampó de rentat (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0).
- Tampó d'elució (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0).
- Coomassie (apartat 2.1.4.).
- Centriprep (Millipore).

Procediment:

A) Producció i solubilització de les proteïnes a petita escala: amb la finalitat de trobar les condicions òptimes de producció de les proteïnes. Les mostres es manipulen a 4°C.

1. Els vectors d'expressió Nt-MBP i NusA-Ct s'electroporen en la soca bacteriana BL-21 i es seleccionen les colònies en LB ampicilina.
2. Es pica una colònia aïllada de cada construcció en 1,5 ml de LB ampicilina en un tub de 15 ml i es deixa créixer 3h a 37°C en agitació 250 rpm.
3. Després de 3h, el cultiu es divideix en 0.5 ml en 3 eppendorf de 2 ml i s'indueix en 3 condicions: control (no induït), 0.4 mM IPTG i 0.8 mM IPTG. S'incuba a 37°C durant 3h en agitació. Els temps d'incubació van ser optimitzats anteriorment pel grup.
4. Passades les 3h, s'agafa una alíquota de 25 µl de totes les condicions (fracció de proteïna total, PT) que es centrifuguen 5 min a 13.300 rpm a 4°C, i els pèl·lets es congelen a -20°C.

5. La resta dels medis induïts amb IPTG es centrifuguen 5 min a 13.300 rpm a 4°C, es descarta el sobrenedant i es congelen els pèl·lets per la seva posterior solubilització.
6. Solubilització: els pèl·lets es resuspenen en 200 µl del tampó de llisi i s'incuben a 4°C durant 30 min a l'orbital. Es centrifuguen 5 min a 13.300 rpm a 4°C, es guarden els sobrenedants (fracció de proteïna soluble, PS), i els pèl·lets es resuspenen amb 200 µl del tampó de llisi (fracció de proteïna insoluble, PI).
7. Un cop tenim les diferents fraccions, s'agafen els pèl·lets de PT i es resuspenen amb 25 µl de tampó de càrrega LSB 1x en condicions reductores de 100 µM DTT. De les fraccions de PS i PI, s'agafen aliquotes de 20 µl i s'hi afegeix 25 µl de LSB 2x amb DTT. S'escalfen les mostres a 95°C durant 5 min i es processen per electroforesi SDS/PAGE amb la posterior tinció de coomassie.

Les condicions òptimes es van definir a 0.8 mM IPTG per a la producció de la proteïna Nt-MBP i per NusA-Ct, encara que aquest últim tenia una proporció de proteïna insoluble més gran degut a la hidrofobicitat de la zona Ct.

En la figura 20 es mostra el gel tenyit amb coomassie. Es poden observar les bandes corresponents a l'expressió de les proteïnes de fusió Nt-MBP i NusA-Ct (fletxes) en les diferents condicions de producció (resultats capítol 1).

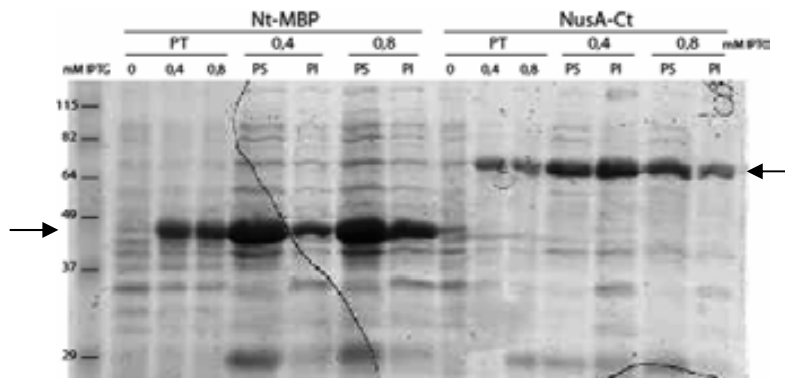


Figura 20. Producció de les proteïnes de fusió Nt-MBP i NusA-Ct analitzat per WB amb tinció de coomassie.

B) Producció i solubilització de les proteïnes a gran escala: seguint el protocol de *QIAexpressionist* i *QIAexpress System* (Qiagen), el qual es basa en l'afinitat i la selectivitat de les proteïnes fusionades a residus d'histidina per la matriu de cromatografia d'àcid níquel-nitrilotriacètic (Ni-NTA) *metal-affinity* (Porath et al. 1975). Es procedeix amb el protocol 9.

1. Es pica 1 colònia de cada construcció en 5 ml de LB ampicilina i s'incuba a 37°C en agitació tota la nit. Es transvasa a 1 l de LB ampicilina i es deixa créixer fins que la densitat òptica a 600 nm és de 0,5.

2. S'indueixen els cultius amb 0.8 mM IPTG durant 3h a 37°C en agitació, es centrifuguen 10 min a 6000g, es descarta el sobrenedant i el pèl·let es congela.
3. Es resuspenen els pèl·lets amb 10 ml de tampó de llisi que conté DNasa I (5 µg/ml) i RNasa A (10 µg/ml). Es deixa 1h a l'orbital, es sonica en gel durant 2 min en intervals de 10 seg i es centrifuga durant 20 min a 10000g a 4°C.
4. Es preparen les columnes de Ni-NTA (6 ml) i s'equilibren amb el tampó de llisi.
5. El sobrenadant (proteïna soluble) es purifica utilitzant les columnes de Ni-NTA, s'incuben els 10 ml del sobrenadant durant 1h a l'orbital a 4°C.
6. Es fan 2 rentats de la columna amb el tampó de rentat i es fan 4 eluïts de 2 ml del tampó d'elució.
7. Es quantifica la concentració de proteïna pel mètode de Bradford i es prova la seva integritat per WB.

Diàlisi de les proteïnes: per tal de poder tenir les proteïnes en el medi desitjat o lliures d'impureses. En aquest cas, les proteïnes de fusió s'acoblen a una columna d'Aminolink (apartat 2.1.8.2.) per tal de poder purificar els anticossos contra MLC1, per provar possibles interaccions, etc. La diàlisi s'efectua introduint les mostres en les bosses de diàlisi i submergint-les en el tampó desitjat a 4°C en agitació, fent canvis de tampó i deixant l'últim canvi tota la nit. Un cop s'obté la mostra dialitzada, es concentra amb el sistema de Centriprep fins a un volum de 2 ml. En cada pas es pot valorar la concentració de proteïna.

2.6. Immunoprecipitació (IP)

Es tracta d'una tècnica que permet precipitar una proteïna (antigen) de manera específica utilitzant un anticòs. Aquest anticòs s'uneix a una resina d'acrilamida o de sefarosa que permet la precipitació de l'anticòs o de la proteïna, juntament amb les proteïnes que porten unides.

En aquest treball es realitzaren dues variacions de la tècnica, la clàssica amb proteïna A sefarosa i l'ús d'un kit comercial de immunoprecipitació en columna. Els experiments de co-immunoprecipitació es van realitzar a partir d'extractes de cel·lulars, així com a partir de teixit (sencer o membranes).

2.6.1. Immunoprecipitació clàssica amb proteïna A sefarosa

Amb aquesta tècnica es van fer les proves d'immunoprecipitació amb extractes proteics solubles d'astròcits, teixits, i membranes de cervell de rata i de cervell humà utilitzant diferents anticossos (que es descriuen en el capítol corresponent de resultats).

És indispensable realitzar un control negatiu per tal de descartar la precipitació inespecífica amb la proteïna A sefarosa, per això sempre es processen dues mostres en paral·lel. S'ha de tenir en compte que el procés de solubilització de la mostra s'ha de fer el mateix dia que la immunoprecipitació ja que, en el nostre cas, es treballa amb proteïnes de membrana que

tendeixen a agregar en el procés de congelació. Com s'ha comentat anteriorment, es van fer proves d'immunoprecipitació solubilitzant amb diferents detergents (Tritó X-100, DDM i complexiolyte 47) i diferents mostres (astròcits de rata, cervell de rata i cervell humà, i membranes totals de cervell de rata). Les co-immunoprecipitacions descrites aquí es van realitzar amb membranes de cervell de rata o amb cultius d'astròcits, i amb el detergent complexiolyte 47.

1. Prèviament, es van solubilitzar les mostres amb una relació 1 mg proteïna / 1 ml complexiolyte47 més els inhibidors de proteases i es va valorar la concentració proteica. El procés es porta a terme a 4 °C.
2. A la fracció soluble, 300 µg de proteïna, s'hi afegeixen 30 µl d'anticòs per les IP+ (pel control, no s'hi posa anticòs) i es guarda una al·lota d'extracte total (TE). Les mostres s'incuben d' 1 a 3h a 4 °C a l'orbital.
3. Seguidament, es posen les mostres en contacte amb 30 µl de proteïna A sefarosa, pre-equilibrades prèviament rentant la sefarosa varies vegades amb 200 µl de tampó de solubilització. S'incuba entre 3 i 16 hores, depenent de l'eficiència de immunoprecipitació, a 4°C a l'orbital.
4. Finalitzat el procés d'immunoprecipitació, es realitza una centrifugació de la proteïna A sefarosa, i es separa del sobrenedant. D'aquest pas s'obté un pèl·let negatiu (control) i un positiu (anticòs més proteïna), un sobrenedant (SN) negatiu i un de positiu. Es renten els pèl·lets 3 cops amb el tampó de solubilització, centrifugant, i finalment, als pèl·lets se'ls hi afegeix 100 µl de LSB 1x, 5% β-mercaptoetanol i s'incuben a 60 °C durant 15 min, per tal de trencar les unions de l'anticòs amb la reïna i de l'anticòs amb l'antigen. Mitjançant una centrifugació s'obté l'eluït (E). Els sobrenedants es processen de forma normal per a electroforesis de proteïnes.

La co-immunoprecipitació s'analitza per WB, immunodetectant amb anticossos contra la proteïna immunoprecipitada i contra les diferents proteïnes que interaccionin amb ella. Es carreguen 50 µg de proteïna tant de l'extracte total, com del sobrenedant i de l'eluït, així es poden comparar les diferents mostres. La immunoprecipitació és positiva quan es veu la proteïna immunoprecipitada a l'eluït positiu i no al negatiu. Es pot realitzar un procés previ de neteja de la mostra IP+, anomenat *pre-clearing*, que redueix les unions inespecífiques. Aquest consisteix en incubar la mostra amb proteïna A sefarosa prèviament al procés d'immunoprecipitació.

2.6.2. Immunoprecipitació amb el sistema Aminolink Plus Immobilization kit (Pierce 44894 20394)

Aquest sistema permet la immobilització eficient de pèptids o de proteïnes a un suport sòlid mantingut en columna d'afinitat. La unió covalent de pèptids i d'anticossos permetent la immunopurificació per afinitat proteica sense la seva pèrdua, així, el sistema permet ser reutilitzat i es pot fer servir el mateix anticòs per immunoprecipitar i per a la posterior detecció per WB.

La matriu està formada per 4% agarosa entrecreuada, activada per formar grups funcionals aldehids. Les amines primàries reaccionen amb aquests grups funcionals, reduint-se per a formar una amina secundària que queda covalentment unida a la matriu. El sistema permet dos protocols diferents, variant el pH del buffer d'acoblament per a proteïnes sensibles a pH.

En aquest treball es prepararen 4 columnes diferents, unint-hi: (i) la proteïna de fusió MBP-Nt de MLC1 humà (que ens servirà per purificar l'anticòs contra MLC1 Nt humà); (ii) l'anticòs contra el pèptid N4 i N5 de MLC1 humà; (iii) l'anticòs contra MLC1 humà purificat amb la columna anterior (MBP-Nt), ambdós produïts en conill, i (iv) BSA (albúmina sèrica bovina (Sigma-Aldrich)) com a control negatiu. En aquest treball, també s'ha modificat el protocol d'immunoprecipitació ja que s'utilitza l'agarosa unida covalentment als anticossos per fer les co-immunoprecipitacions, però es realitzen "en batch", seguint el protocol de la clàssica.

Muntatge de les columnes (segons protocol del proveïdor)

Prèviament al muntatge de les columnes, les proteïnes de fusió, els anticossos i la BSA van ser dialitzats en tampó d'acoblament pH 10, obtenint 2-3 ml a una concentració de 1-2 mg/ml. Es van seguir les indicacions del proveïdor, utilitzant en aquest cas el procediment a pH 10. Es va aconseguir una eficiència d'acoblament del 75% aprox.

Materials i reactius:

- Tampó d'unió (0,1 M citrat sòdic, 0,05 M carbonat sòdic, pH 10).
- Tampó d'unió (PBS, pH 7.2).
- Tampó d'acoplament (1M tris-HCl, 0.05% NaN_3 , pH 7.4).
- Tampó de conservació (PBS, 0.05% NaN_3).
- Tampó de rentat (1 M NaCl, 0.05% NaN_3).
- Proteïna (2 ml en 2 ml del tampó d'unió).
- Cianoborohidrur de sodi (NaCNBH_3 , 5 M).

Procediment:

1. Es deixa atemperar la columna que conté l'agarosa a temperatura ambient i es deixa drenar la solució.
2. S'equilibra l'agarosa amb 5 ml del tampó d'unió i es deixa drenar. Es tapa la part de sota.
3. S'afegeixen els 4 ml de la proteïna diluïda amb el tampó d'unió, guardant una alíquota. S'incuba durant 4 h en l'orbital. Es drena el líquid (es guarda una alíquota) i es renta amb 5 ml del tampó d'unió pH 7.2.
4. Es tapa i s'afegeixen 2 ml del tampó d'unió pH 7.2 més 40 μl de NaCNBH_3 i es deixa reaccionar durant 4 h a temperatura ambient o 16 h a 4°C.
5. Es renta amb 4 ml de tampó d'acoplament i es tapa. S'afegeixen 2 ml del tampó d'acoblament més 40 μl de NaCNBH_3 i es deixa incubar 30 min a temperatura ambient amb agitació moderada.

6. Es renta la columna amb 15 ml de la solució de rentat, s'equilibra amb 4 ml de tampó de conservació i, per guardar-les, s'afageixen 2 ml del mateix tampó amb 0,05% NaN₃. Es guarden ben tapades a 4°C.

Es valora la proteïna de l'aliquota inicial i de l'aliquota de no-unida per saber quin percentatge d'unió a l'agarosa s'ha obtingut.

Protocol general d'immunoprecipitació per afinitat

A) Purificació d'anticossos per afinitat: és el mateix protocol descrit a l'apartat 2.1.6. (purificació de sèrum per afinitat). En aquest treball, s'ha purificat l'anticòs contra la proteïna Nt de MLC1 humana amb la columna que porta unida la proteïna de fusió MBP-Nt. La figura 21 mostra la purificació de l'anticòs Nt amb la columna on s'hi ha unit la proteïna de fusió Nt-MBP (resultats capítol 1).

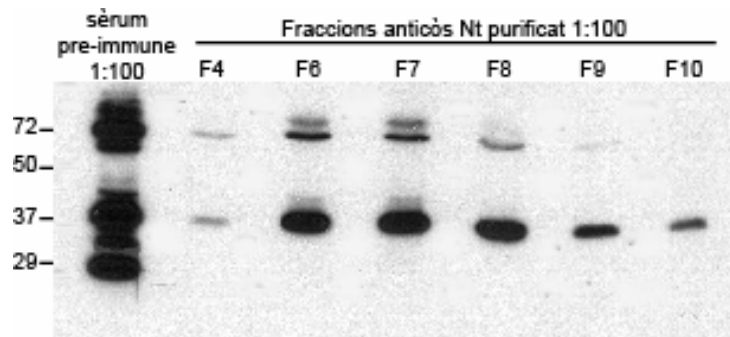


Figura 21. Purificació de l'anticòs MLC1 Nt. El WB va ser carregat amb 30 µg d'un extracte de cèl·lules HeLa transfectades amb el plàmid HA-hMLC1. S'observa el patró de bandes del sèrum pre-immune (1:100), i les diferents fraccions on s'ha eluït l'anticòs purificat. Aquestes fraccions s'ajunten i es valora la concentració d'IgG. S'aliquota i es guarda a -80°C.

B) Co-Immunoprecipitacions en batch

Aquest procediment és similar al descrit en l'apartat 2.1.8.1. amb algunes modificacions: s'utilitza l'agarosa unida covalentment als anticossos, com en l'apartat anterior, per realitzar les immunoprecipitacions. S'ha de realitzar un control prèvi per establir la relació proteïna:reïna amb la qual tenim el màxim de proteïna immunoprecipitada. Un cop establerta la relació, es procedeix a les immunoprecipitacions. Els extractes solubilitzats es posen en contacte amb l'agarosa-anticòs amb una relació 100 µg proteïna/10 µl agarosa-anticòs en tubs eppendorfs i s'incuba 3h a 4°C. Després dels rentats, s'elueix amb LSB 1x.

3. CULTIUS CEL·LULARS

La manipulació dels cultius cel·lulars implica treballar amb unes condicions de màxima esterilitat i higiene. Qualsevol petita contaminació, sigui d'origen fúngic o bacterià, comprometrà l'experiment que s'està portant a terme. Es treballa sota una campana de flux vertical, amb materials i medis estèrils per autoclavat o filtrat.

3.1. LÍNIES CEL·LULARS

En aquest treball s'han utilitzat, principalment, tres línies cel·lulars: HeLa, HEK 293 i MDCK. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i per tenir incorporades seqüències de papilomavirus humà (HPV-18). La línia HEK deriva de cèl·lules d'epiteli renal humà, està transformada amb el gen *E1A* d'adenovirus (Graham *et al.* 1977). La línia MDCK (Madin-Darby Kidney Canine Kidney) deriva d'epiteli renal caní i s'utilitza comunament per a l'estudi de propietats d'unions tipus *tight* (TJ) quan es cultiven en *transwells*. En casos puntuals s'han provat d'altres línies per trobar una línia cel·lular que expressés de forma endògena la nostra proteïna com C6 glioma, U251 glioma, RGC-5 (Retinal Ganglion cell line 5, de rata), limfòcits humans (creixen en suspensió), SK-N-JD, LAU-5s, SH-5YSY, LA1-55N, etc., sense èxit.

3.1.1. Condicions generals de cultiu

Les condicions de cultiu per a aquestes línies cel·lulars, així com per a la majoria de línies, són a 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. El medi de cultiu per cèl·lules adherents és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biological Industires) sense suplementar que es guarda a la nevera de 4°C. El medi per les cèl·lules que creixen en suspensió és RPMI (Biological Industires). La complementació consisteix en afegir al medi sèrum fetal boví (FBS, prèviament tractat a 56°C durant 30 min per tal d'inactivar el complement i els anticossos), antibiòtics, penicil·lina (inhibidors de la síntesis de peptidoglicans de la paret bacteriana) i estreptomycina (inhibidor de la subunitat ribosomal 70S). També es complementa amb L-Glutamine.

El medi es canvia cada dos-tres dies (és important preatemperar-lo primer a 37°C) i es fa un seguiment del creixement del cultiu de manera que quan s'està proper a la confluència es tripsinitza i es torna a sembrar el cultiu més diluït.

Les cèl·lules MDCK que han estat descrites per a l'estudi de les unions tipus *tight*, permeten la seva polarització quan es cultiven en cistella (*transwell*), de manera que es pot monitoritzar la resistència elèctrica transepitelial (TEER) de la monocapa, paràmetre dependent de les propietats de les unions TJ (Kovbasnjunk *et al.* 1998). Els *transwells* es pre-tracten amb collagen tipus I de rata (DMEM, 20 µg/ml collagen) a la part apical, s'incuba 1 h a 37°C i s'aspira el medi. Es deixa reposar 15 min a campana i s'hi afegeix medi DMEM, tant a la part apical com a la part basolateral. En aquestes condicions es pot guardar a la nevera. Les cèl·lules MDCK es sembren a la part apical i es va mesurant la TEER, quan aquesta augmenta, la monocapa de cèl·lules ja està formada. Els canvis de medi es fan de manera seqüencial, primer, s'aspira el medi de la part basolateral i després el medi de la part apical. Per re-omplir, es fa començant per la part apical i seguint per la basolateral, així ens assegurem que no es desenganxa la monocapa de cèl·lules.

3.1.2. Tripsinització

Quan el cultiu cel·lular arriba aproximadament al 100% de confluència, cal tripsinitzar-lo per evitar que comencin a morir les cèl·lules. Per a tripsinitzar un cultiu, primerament s'elimina el medi i s'efectuen 2-3 rentats amb PBS 1x estèril, en cas contrari, els factors presents en l'FBS del medi inhibeixen l'acció de la tripsina. A continuació s'afegeix al cultiu tripsina-EDTA 1x (Biological Industries). Es deixa incubar de 5 a 15 min a l'incubador de 37°C. Quan s'observa al microscopi que les cèl·lules s'han desenganxat i disgregat, s'hi afegeix medi de cultiu i es resuspenen. A continuació, les cèl·lules es poden comptar i sembrar o fer un passatge de manteniment.

3.1.3. Congelació de cèl·lules

Les cèl·lules eucariotes suporten processos de congelació quan aquesta es dona de forma gradual i amb la presència d'un crioprotector que evita la formació de cristalls d'aigua que puguin trencar la cèl·lula.

Una vegada s'han tripsinitzat, es passen les cèl·lules a un tub i es centrifuguen 5 min a 1000 rpm. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let de cèl·lules amb DMEM complet, 10% DMSO (també es pot fer amb FBS, 10% DMSO) 1 ml per cada $3 \cdot 10^6$ cèl·lules. Es fan alíquotes d'1 ml en criotubs i, utilitzant un *cooler*, es proporciona una congelació gradual. El criotubs es dipositen al congelador de -80°C entre 10 i 16 hores i seguidament es dipositen en nitrogen líquid a -190°C.

3.1.4. Descongelació de cèl·lules

La descongelació s'efectua de manera ràpida, al contrari de la congelació, amb l'objectiu d'eliminar ràpidament el DMSO, tòxic per a les cèl·lules.

El criotub es posa en un bany a 37°C. Una vegada descongelat es resuspèn en un volum 10 vegades superior del medi pre-atemperat. Seguidament, es centrifuga a 5 min a 1000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El pèl·let de cèl·lules es resuspèn en 10 ml de medi, es plaqueja i es deixa créixer a l'incubador.

3.2. CULTIUS PRIMARIS

Davant la impossibilitat de trobar una línia cel·lular que expressés de forma endògena MLC1, es va optar per realitzar cultius primaris d'astròcits, mixtos i neurones, ja que ambdós tipus cel·lulars expressen endògenament MLC1 (McCarthy *et al.*, 1980, Baorto *et al.*, 1992 i Ahlemeyer *et al.*, 2005). Aquest protocol està aprovat pel comitè ètic de la Universitat de Barcelona i l'Estabulari de Bellvitge.

Materials i reactius

- Rates soca Sprague-Dawley (Charles River), cries en estadi P0-P3.
- Rata prenyada en estadi E18.
- Material de cirurgia (tissores, pinces de microcirurgia, bisturí, etc.).
- Pipetes Pasteur estèrils de vidre i plaques de Petri.

- Tubs (15ml i 50ml), flascons de 25ml, i filtres 100µm (Falcon).
- Camera de Neubauer.
- Lupa binocular.
- Medi de dissecció (PBS 1x, 0.3% BSA, 0.6% glucosa, estèril, a 4°C).
- Medi de cultiu DMEM complet (10% FBS, 0.25% penicil·lina/estreptomicina, 0.25% glutamina).
- Medi Neurobasal NB complet (B27 1x, 0.25% penicil·lina/estreptomicina, 0.25% glutamina, 0.045% NaHCO₃).
- Tripsina-EDTA 1x .
- DNAsa I (1000 U/ml en 0.15M NaCl).
- Poli-D-Lisina i Laminina (Sigma).
- Ara-C (Sigma).

Tractament de les plaques de cultiu i dels cubre-objectes:

Per tal d'assegurar la màxima adherència del cultiu a la placa, es tracten les superfícies amb poli-D-Lisina sola per astròcits i amb laminina per a les neurones i per als cultius mixtos.

Es col·loquen els cubre-objectes a la placa i s'afegeix una solució de poli-D-lisina 100 µg/ml en aigua milliQ o directament sobre les plaques a 0.5 µg/ml en aigua milliQ. Es deixa d'1h a tota la nit a l'incubador. Es retira i es fan 3 rentats amb aigua milliQ. Per les neurones, es fa un segon tractament amb laminina 4 µg/ml en PBS i s'incuba d'1h a tota la nit a l'incubador. Es fan 3 rentats amb PBS i es poden guardar a 4°C.

3.2.1. Cultius primaris d'astròcits

Metodologia:

Dissecció

Els cultius primaris d'astròcits s'obtenen a partir d'escorça-hipocamp de rata en estadi P0-P3. El procés d'extracció del cervell i microdissecció es realitza sempre en fred, damunt un suport en contacte amb gel, i en les condicions d'esterilitat possibles.

1. Les cries són anestesiades en gel i posteriorment es procedeix a la seva decapitació amb unes tisores. A continuació es disposen els caps en una placa de petri es procedeix a disseccionar el crani, prèvia extracció de la epidermis, seguint la línia mitja. A continuació, amb l'ajuda d'unes pinces, s'obre el crani pel tall i s'extreu el cervell.
2. Els cervells es disposen en una altra placa amb medi de dissecció fred. Es col·loquen els cervells a la lupa i s'extreuen primerament els bulbs olfactius i el romboencèfal. A continuació, es separen els dos hemisferis per la línia mitja i s'extreuen les meninges dels hemisferis cerebrals amb les pinces.

Tractament i sembra

3. Una vegada hem aïllat les escorces, es procedeix a la seva disgregació mecànica i enzimàtica. Es transfereixen a una placa de 100 mm i s'hi afegeix 10 ml de tripsina. S'incuba a 37°C a l'incubador durant 10 min.
4. Es traspassen a un tub de 50 ml amb 5 ml de DMEM i DNAsa (1/50) i es procedeix a la disgregació mecànica amb pipeta pasteur de vidre utilitzant cada vegada una pipeta de porus més petit. S'afegeixen 5 ml de medi més i es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 min.
5. Es retira el sobrenedant i s'hi afegeix 10 ml de DMEM complet. Es passa per un filtre de 100 µm per evitar els grumolls i es sembren en flascons a raó d'1 flascó per cada 3 cries de rata. Es canvia el medi el dia següent.

Purificació del cultiu d'astròcits

Una vegada sembrat el cultiu, que estarà format per cèl·lules glials (astròcits, oligodendròcits i microglia) es deixa créixer de 10 a 13 dies fins a la confluència. Per eliminar els oligodendròcits i la microglia, es procedeix a fer una agitació mecànica forta ja que els astròcits s'enganxen molt bé a la placa de cultiu mentre la resta de cèl·lules no. Per aquest pas, unes hores abans es canvia el medi dels flascons i es deixa equilibrar a l'incubador per tal de que agafi la concentració adequada de CO₂. En un incubador a 37°C s'hi instal·la l'agitador i els flascons, amb el tap ben segellat amb *parafilm*, i es deixa agitant a 250rpm 12-16h. Després d'aquest procés, s'obtenen uns cultius primaris de rata d'un 95% de puresa (per immunocitoquímica amb un marcador d'astròcits (GFAP)). Es retira el sobrenedant, es fan 3 rentats amb PBS 1x, es tripsinitzen els astròcits i es procedeix a la sembra. Es sembren a una densitat de 50.000-80.000 cèl·lules en plaques de 24 pous, 250.000-400.000 cèl·lules en plaques de 6 pous i 10⁶ cèl·lules en plaques de 100 mm. El medi es canvia cada 3-4 dies fins que arriben a una confluència del 75%. Com es descriu als resultats, els cultius d'astròcits s'aturen a la fase G0/G1 amb un inhibidor de la síntesi de DNA, l'Ara-C 1µM, per tal de promoure'n la seva diferenciació.

3.2.2. Cultius primaris mixtos d'astròcits i de neurones

Els cultius mixtos d'astròcits i de neurones s'obtenen a partir d'hipocamps de rata P0, ja que sinó, la supervivència de les neurones es veuria reduïda.

El procés es similar al descrit pels astròcits però amb petites modificacions:

Els apartats 1-4 són iguals.

5. Es retira el sobrenadant i s'afegeix NB complet, s'homogenitza i es procedeix al recompte de cèl·lules amb la càmera de Neubauer. Es sembren sobre cubre-objectes en multipous de 24 pous a una densitat de 20.000 cèl·lules/pou, 250.000 cèl·lules/pou en multipous de 6 pous i 10⁶ cèl·lules en plaques de 100 mm., prèviament tractats amb poli-D-lisina i laminina.
6. Es canvia el medi 4 dies després de la sembra, de manera que es canvien 3/4 parts del volum per evitar que les neurones es desenganxin o s'assequin. Es controla el creixement dels

astròcits i en el moment en què estan al 20% de confluència s'afegeix AraC 1 μ M al medi per tal d'inhibir el seu sobre-creixement i el de qualsevol tipus de glia. El medi es canvia cada 4 dies.

3.2.3. Cultius primaris de neurones

El cultiu primari de neurones d'hipocamp es fa a l'estadi embrionari dia 18 (E18). El protocol és similar amb modificacions: es sacrifica la rata prenyada amb CO₂, tal i com estableix el protocol de l'estabulari. Amb el material de cirurgia, s'extreuen els embrions per cesària. Es procedeix amb els punts 1-4 i 5 del protocol pels cultius mixtos.

6. El medi es canvia el dia següent de manera que es treuen les 3/4 del volum i es re-omple de medi NB fresc on s'hi afegeix l'AraC 1 μ M o Uridina/Fluouridina (50/20 μ g/ml) per evitar la proliferació de la glia. El medi es canvia cada 4 dies.

3.3. TRANSFECCIÓ DE CÈL·LULES

La transfecció dels diferents tipus cel·lulars s'ha fet amb el sistema de liposomes utilitzant Lipofectamina (per la línia HEK) o Lipofectina (pel cultiu d'astròcits primaris). Els cultius primaris d'astròcits presenten una baixa eficiència de transfecció i una alta mortalitat. Per això, es va provar una bateria d'agents per tal d'optimitzar les condicions de transfecció, tant en relació DNA:agent com en els temps d'incubació. Els agents que es van testar van ser lipofectamina 2000 (Invitrogen), Lipofectina (Invitrogen), Dotap i Dotap+Dope (Sigma), Fugene6 (Roche) i jetPEI (Polyplus Transfection). L'agent de transfecció que va funcionar millor va ser la Lipofectina. Les quantitats de DNA que es transfecten són de 0,5 μ g per a les plaques de 24, 1 μ g de DNA per a les plaques de 6 i 10 μ g de DNA per a les plaques de 100 mm.

Materials i reactius:

- Cultiu cel·lular al 60% de confluència (en el cas d'astròcits sembrats en poli-D-lisina).
- Lipofectina i Lipofectamina 2000.
- Opti-MEM.
- Opti-MEM, 10% FBS.
- DNA.

Metodologia

El procediment a seguir i els volums per a cada tipus de plaques venen descrits en el manual del producte. El següent protocol està optimitzat per a plaques de 24 pous.

1) Transfecció de les línies HEK293 i HeLa: es prepara la barreja de 1.5 μ l de lipofectamina amb 25 μ l d'Opti-MEM i es deixa reposar 15 min per assegurar la formació dels liposomes. En un altre tub, es prepara 0.5 μ g de DNA amb 25 μ l d'opti-MEM, amb una relació 1:3 (DNA:lipofectina). S'ajunten les dues barreges i es deixen incubar 30 min. Mentrestant, es retira el medi de les plaques i s'hi posa 150 μ l d'opti-MEM, 10% FBS, per assegurar que les cèl·lules sobreviuen durant el procés d'incubació, i s'equilibra a l'incubador. Acabat el temps, s'afegeix la barreja a la placa,

gota a gota i agitant la placa fins a un volum final de 200 µl. Es deixa incubar de 12 a 16h a l'incubador. Es canvia el medi de les cèl·lules per DMEM complet i es deixa 24-48h a l'incubador per tal que s'expressin les proteïnes.

2) Transfecció d'astròcits primaris: Es prepara la lipofectina i el DNA com s'ha descrit anteriorment però amb una relació 1:2 (DNA:lipofectina). Es retira el medi de les plaques i s'hi posa l'opti-MEM i s'equilibra a l'incubador. S'afegeix la barreja a la placa, gota a gota i agitant la placa. Es deixa incubar d'1 a 3h a l'incubador, controlant la viabilitat de les cèl·lules. Es canvia el medi de les cèl·lules per DMEM complet (amb Ara-C) i es deixa 24-48h a l'incubador per tal que s'expressin les proteïnes.

3.4. PRODUCCIÓ D'ADENOVIRUS

Amb la finalitat de tenir eines per treballar, tant amb els cultius primaris com amb els miRNAs, es va decidir optar per la producció d'Adenovirus, atès que aquests són relativament fàcils d'obtenir i de manipular. La seva eficiència d'infecció és molt alta i, per tant, l'expressió de les proteïnes també és molt alta.

3.4.1. Producció d'adenovirus

El sistema que s'ha utilitzat per a la seva obtenció és *ViraPower Adenoviral Expression System* (Invitrogen). Aquest sistema ens permet crear adenovirus (AdV) no replicatius ni integratius que són usats per a l'expressió temporal del gen d'interès, tant en cèl·lules eucariotes divisores com en les no divisores. S'obtenen uns estocs virals d'alt títol, els quals es poden amplificar i purificar com s'explica posteriorment. S'ha de tenir en compte que s'ha de treballar en condicions de Bioseguritat 2.

Els AdVs entren a la cèl·lula unint-se al receptor Coxsackie/Adenovirus (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997). Un cop unit al CAR, l'AdV és internalitzat per endocitosi mediada per la via de les integrines (Russell *et al.*, 2000) i transportat al nucli. Un cop en el nucli, s'inicia la transcripció i traducció de les proteïnes tempranes com l'E1, seguit de l'expressió dels gens tardans i de la replicació viral. El cicle de vida viral és d'aprox. de 3 dies. Aquesta tecnologia està basada en els vectors de segona generació (Bett *et al.*, 1994).

El vector d'expressió pAdV/CMV/V5-DEST (figura 21) conté els ITRs 5' i 3', la senyal d'encapsidació, etc., necessaris per empaquetar el nostre gen en els virions, però té la delecció de les proteïnes E1 i E3 que evita la replicació. La proteïna necessària per a l'expressió dels gens tardans, E1, està integrada a la línia cel·lular HEK293 en *trans*, la qual s'utilitza per a la seva producció.

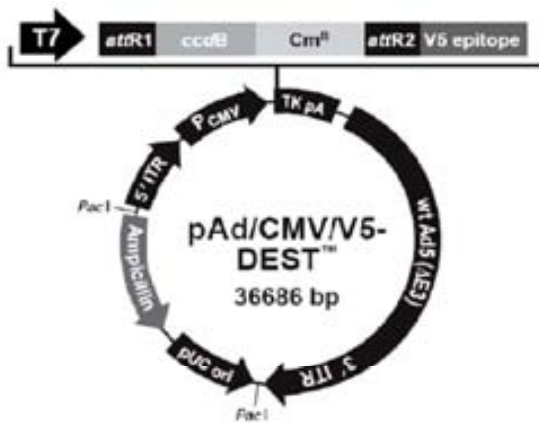


Figura 22. Vector d'expressió d'adenovirus pAd/CMV/V5-DEST compatible amb el sistema Gateway.

Producció d'Adenovirus: Primerament, es construeixen els vectors d'expressió amb les seqüències d'interès en el vector pAd/CMV/V5-DEST pel sistema Gateway.

1. Es sembren les cèl·lules HEK293 (de passatge baix) en plaques de 6 pous ($5 \cdot 10^5$ cel/pou) amb medi DMEM que conté aminoàcids no essencials (NE-AA) i s'incuba a 37°C a l'incubador de 12 a 16h.
2. Paral·lelament, per tal d'exposar els ITRs virals, es digereix de 5-10 μg del plàsmid amb *Pac I* a 37°C de 12 a 16h. Es purifica la digestió amb el kit de Roche i es precipita per tal de concentrar el DNA. Posteriorment es quantifica.
3. Es transfecta 1 μg de DNA digerit amb *Pac I* a les HEK293 amb lipofectamina 2000 amb una relació 1:3 (DNA:Lipofectamina) utilitzant Opti-MEM amb el 10% FBS. Es deixa incubar tota la nit a l'incubador a 37°C .
4. El dia següent, es canvia el medi per DMEM complet amb NE-AA i es deixa incubar 24h més a l'incubador.
5. A les 48h de post-transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i es transfereixen a una placa de 100 mm. Es deixen incubar (si és necessari, es canvia el medi) de 10-13 dies fins que aparegui el 80% d'efecte citopàtic.
6. Es recull el medi i les cèl·lules (cru viral) i es transfereixen a un tub de 15 ml. Es fan 3 cicles de congelació a -80°C i de descongelació de 10 min a 37°C , i es centrifuga el llistat cel·lular 15 min a 13.300 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars.
7. Es fan al·lotes d'1 ml del sobrenedant en criovials que es guarden a -80°C . Encara que els estocs virals són bastant estables als processos de congelació/descongelació, és recomanable no usar estocs que hagin estat descongelats més de 10 vegades, atès que el títol anirà disminuint.

3.4.2. Purificació d'Adenovirus

Els estocs viral produïts en l'apartat anterior estan compostos, a part de per les partícules virals, per medi i per restes cel·lulars que ens poden interferir en els experiments posteriors d'infecció, sobretot quan es necessiti una multiplicitat d'infecció (MOI) molt alta, com passa en el cas de les

neurones. Per evitar aquests problemes, els adenovirus s'amplifiquen i es purifiquen per tal de tenir un estoc concentrat i net, amb un *kit* comercial *Adeno-X Virus Mini Purification Kit* (Clontech).

1. Amplificació de l'adenovirus: es sembra una placa de 100 mm amb HEK293 de passatge baix amb medi DMEM NE-AA i s'infecta amb una MOI de 1 de l'adenovirus a purificar (la infecció es pot fer en cèl·lules en suspensió o adherides a la placa).
2. S'incuba de 2 a 4 dies fins que l'efecte citopàtic és complet.
3. Purificació de l'Adenovirus: es recull el medi i totes les cèl·lules directament de la placa i es posen en un tub de 15 ml. Es centrifuga a 1000 rpm 5 min i es resuspèn el pèl·let de cèl·lules amb 0.8 ml de medi fresc en un eppendorf.
4. Es llisen les cèl·lules amb 3 cicles consecutius de congelació/descongelació, congelant les cèl·lules amb neu carbònica, descongelant-les a un bany a 37°C i barrejant-les enèrgicament.
5. Es centrifuga a 10.000 rpm durant 10 min per descartar les restes cel·lulars. Es transfereix el sobrenedant a un altre eppendorf (en aquest punt es pot congelar a -80°C o procedir amb la purificació).
6. A partir d'aquí, s'utilitza el *Adeno-X Virus Mini Purification Kit*. S'equilibra la columna amb 0.4 ml de la solució d'equilibri, es centrifuga a 2.000 rpm 5 min i es descarta el centrifugat.
7. S'aplica 0.4 ml del virus a la columna, es centrifuga 2.000 rpm 5 min i es descarta el centrifugat. Es repeteix el procés pels 0.4 ml restants.
8. Es renta la columna amb 0.4 ml de la solució de rentat, es centrifuga 2.000 rpm 5 min i es descarta el centrifugat. Es repeteix el procés 2 cops més.
9. Es diposita la columna a un tub eppendorf net i s'elueix el virus amb 0.4 ml de la solució d'elució per centrifugació a 2.000 rpm durant 5 min. Es procedeix a la titulació del virus i s'aliquota per a la seva conservació a -80° C.

3.4.3. Titulació d'adenovirus

La titulació de les partícules virals es pot fer per 2 mètodes, depenent de si l'adenovirus que s'ha construït expressa una proteïna fluorescent o no. En el primer cas, quan tenim l'avantatge que la infecció pel virus dóna fluorescència, el mètode de titulació és per citometria de flux, mentre que en els casos que no es pugui mesurar la fluorescència, es fa la titulació per elisa seguint un protocol descrit de tinció amb α -Ad/hexon (Majem et al., 2006). Generalment, el títol s'obté utilitzant les mateixes cèl·lules de producció, les HEK293, però s'ha de tenir en compte que no tots el tipus cel·lulars s'infecten per igual. Així doncs, es pot titular l'adenovirus amb qualsevol línia cel·lular.

Titulació per citometria de flux

1. Es sembren les HEK293 a 100.000 cèl·lules/pou en una placa de 24 pous amb medi DMEM complet que conté NE-AA. Es deixen incubar de 12 a 24 h a l'incubador a 37°C.
2. Es retira el medi i s'afegeix medi fresc el mínim de volum possible a cada pou (250 μ l) per afavorir que les partícules virals estiguin en contacte amb les cèl·lules. Es procedeix a fer la

infecció del virus en una sèrie de dilucions 1/1000, 1/100, 1/10 i directament de l'estoc 1 µl, 10 µl i 100 µl. D'aquesta manera es cobreix el rang de títol. Es deixen incubar 12h a l'incubador a 37°C.

3. Es canvia el medi i es deixa incubar 24h més per tal de deixar temps suficient perquè es pugin expressar les proteïnes fluorescentes per les quals codifica el virus (es recomanable no sobrepassar aquest temps per evitar infeccions secundàries).
4. Es fan 3 rentats amb PBS 1x, es tripsinitzen amb 50 µl, s'afegeixen 500 µl de medi DMEM per desactivar la tripsina i es posen a un eppendorf. Es centrifuguen 5 min a 1000 rpm, s'espira el medi i es resuspèn el pèl·let amb 600 µl de paraformaldehid 3% en PBS, per tal de fixar les cèl·lules i no contaminar el citòmetre. El títol es calcula amb la següent fórmula i es dona en *Transduction Units/ml* (TU/ml):

$$\text{TU/ml} = \text{dil.} \times \% \text{ cel fluorescent} \times 1000$$

on el % de cèl·lules fluorescent és el valor de % que dona el citòmetre en funció del número de cèl·lules sembrades.

Titulació pel mètode de l'α-hexon

Aquest mètode es basa en una immunocitoquímica de cèl·lules fent servir un hibridome 2Hx-2, però també es pot realitzar el mètode amb qualsevol altre anticòs.

1. Es sembren les HEK293 a 50.000 cèl·lules/pou en una placa de 96 pous amb medi DMEM complet però 5% FBS que conté NE-AA. Es deixen incubar de 12 a 24 h a l'incubador a 37°C.
2. Es preparen unes dilucions seriades (1/10) de l'estoc viral en un volum final de 100 µl de medi DMEM 5% FBS. Es deixa incubar de 24 a 48h a 37°C.
3. Després de la incubació, es retira el medi acuradament per no trencar la monocapa de cèl·lules i es deixa assecar 5 min a l'aire.
4. Es fixen les cèl·lules afegint 100 µl/pou de metanol 100% fred i s'incuba 10 min a -20°C.
5. S'aspira el metanol i es renten les cèl·lules 2 cops amb 100 µl/pou PBS²⁺ (conté Ca²⁺ i Mg²⁺, fet que afavoreix que les cèl·lules no es desenganxin).
6. S'incuba l'anticòs primari (1/5 si és α-2Hx-2 o 1/100 d'un altre anticòs primari) en 50 µl de PBS²⁺ 1% BSA (s'ha d'evitar la formació de bombolles). Es deixa incubar d'1 a 2 h a 37°C, o tota la nit a 4°C.
7. Es renten els pous 3 vegades amb PBS²⁺ 1% BSA.
8. S'incuba amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor 1/300 en PBS²⁺ 1% BSA. S'incuba d'1 a 2h a 37°C protegit de la llum.
9. Es renten els pous 3 vegades amb PBS²⁺. Es quantifiquen les cèl·lules fluorescentes en un microscopi invertit de fluorescència, si s'observa un núvol de cèl·lules fluorescentes suggereix una infecció secundària i es compta com a una cèl·lula. Es farà el recompte en la dilució on hi hagi més cèl·lules positives que es puguin comptar. Per ex.: es compten 100 cèl·lules positives a la dilució 10⁻⁵, això són 1·10⁷/100 µl i per tant, un títol de 10⁸ TU/ml.

Adenovirus	Títol (TU/ml)	Adenovirus purificats	Títol (TU/ml)
LacZ	$5 \cdot 10^8$	-	
HA-hMLC1-HAloop	$5 \cdot 10^8$	-	
mMLC1	$5 \cdot 10^8$	-	
HA-hMLC1-HAloop S246R	$5 \cdot 10^8$	-	
miRNA SCR-GFP	$4,5 \cdot 10^8$	miRNA SCR-GFP	$5 \cdot 10^9$
miRNA 344-GFP MLC1	$5 \cdot 10^6$	-	
miRNA 756-GFP MLC1	$1,5 \cdot 10^8$	miRNA 756-GFP MLC1	$1 \cdot 10^9$
miRNA 905-GFP MLC1	$3,5 \cdot 10^8$	miRNA 905-GFP MLC1	$4 \cdot 10^9$
miRNA 2088-GFP MLC1	$1 \cdot 10^8$	-	
miRNA SCR-cherry	$1 \cdot 10^7$	miRNA SCR-cherry MLC1	$1 \cdot 10^9$
miRNA 905-cherry MLC1	$1 \cdot 10^7$	miRNA 905-cherry MLC1	$1 \cdot 10^9$

Taula 2. Adenovirus generats. Esquerra, taula on es mostren els diferents adenovirus generats amb el títol corresponent. Dreta, taula amb els virus purificats i el seu títol.

3.5. MESURA DE L'EXPRESSIÓ EN SUPERFÍCIE DE PROTEÏNES DE MEMBRANA PEL MÈTODE DE LUMINISCÈNCIA EN ASTRÒCITS

La tècnica es basa en la detecció immunològica de proteïnes, endògenes o transfectades, a la superfície de la membrana cel·lular (Margeta-Mitrovic, 2002). En aquest treball és va mesurar l'arribada a membrana plasmàtica de la proteïna MLC1 humana i un mutant S246R en astròcits infectats amb l'adenovirus. Les construccions de MLC1 humà (salvatge o mutant) expressades per l'adenovirus, contenen un epítot HA a l'últim *loop* extracel·lular permet detectar la proteïna des de fora la cèl·lula.

Materials i reactius:

- Luminòmetre TD-20/20 (Turner BioSystems, USA).
- Astròcits infectats amb l'adenovirus MLC1 *wild-type* o mutant (MOI 2) en plaques de 35 mm.
- Paraformaldehid (PFA) 3% en PBS.
- PBS 1x.
- Solució de bloqueig (1% BSA en PBS).
- Anticòs primari (3F10 rat anti-HA-biotin, roche).
- Anticòs secundari (anti-rat streptavidin HRP-conjugated).
- Solució Power Signal Elisa (Pierce).
- Solució de llisi (NaOH 200µM, 1% SDS).

Metodologia:

Tot el procés es realitza a temperatura ambient. S'ha de tenir en compte que per a cada mostra (control, MLC1 wt i MLC1 S246R) es fan 4 rèpliques.

1. Les cèl·lules es renten amb PBS 1x i es fixen amb PFA 3% durant 20 min. Es fan 3 rentats amb PBS.
2. Seguidament, s'incuben amb la solució de bloqueig durant 30 min.
3. Després del bloqueig, els astròcits s'incuben 1h amb l'anticòs primari anti-HA-biotin a una dilució 1/500 en solució de bloqueig.
4. Es fan 3 rentats ràpids amb la solució de bloqueig seguides de 3 rentats de 15 min cadascun.

5. S'incuben les cèl·lules 1h amb l'anticòs secundari HRP anti-streptavidin a una dilució 1/1000 en solució de bloqueig.
6. Es fan 3 rentats ràpids i 3 rentats de 15 min cadascun amb solució de bloqueig i 4 rentats ràpid més 4 rentats de 15 min cadascun amb PBS 1x.
7. Es procedeix a revelar afegint directament a la placa, d'una a una, 0.5 ml (0.25 ml solució A i 0.25 ml solució B) del reactiu Power Sigma Elisa. Ràpidament es mesura la quimioluminiscència en el luminòmetre prèviament calibrat.
8. Per tal de poder corregir els valors de quimioluminiscència per a la proteïna total, un cop mesurades totes les plaques, es renten amb PBS 1x i s'hi afegeix la solució de llisi. S'incuba d'1h a tota la nit a 4°C, es centrifuga a 13.300 rpm a 4°C durant 10 min i es quantifica la proteïna utilitzant el mètode de BCA.

4. TÈCNiques D'IMATGE

4.1. ANÀLISI DE LA COLOCALITZACIÓ

La colocalització entre dos fluoròfors en les immunocitoquímiques es fa amb el programa ImageJ (MacBiophotonics) usant el *plug-in Image Correlation Analysis* (ICA). Es basa en els coeficients de correlació de Perason (Rr) i de solapament (R) (Manders et al., 1992). Les imatges o *stacks* han d'estar en el format 8-bits en escala de grisos i la colocalització s'ha de fer un cop s'ha corregit el *background*, per a cada foto i no per a la projecció dels *stacks*.

4.2. DETERMINACIÓ DE LA DIFUSIÓ CEL·LULAR

La permeabilitats de les unions comunicants intercel·lulars o unions *gap* es va mesurar fent servir la tècnica de *scrape-loading* amb Lucifer yellow segons el mètode descrit per El-Fouly (Fouly et al., 1987, Kavanagh et al., 1987) amb algunes modificacions (Tabernero et al., 2001). El Lucifer yellow és una molècula de baix pes molecular, el qual és capaç de difondre a través de les unions entre cèl·lules, però incapaç de difondre a través de la membrana plasmàtica.

Aquesta tècnica es realitza en 2 cultius diferents: en un cultiu d'astròcits en creixement i en un cultiu d'astròcits diferenciats, per tal de comparar la diferència de permeabilitats entre els dos cultius. Es realitzen 2 controls negatius de no-difusió, com són l'inhibidor de d'unions *gap* Octanol (Giaume et al., 1991, Ademark et al., 2004) i una molècula d'alt pes molecular, un Dextrà, que no pot difondre a través de les unions comunicants (Mantz et al., 1993; Opsahl i Rivedal, 2000; Zhang et al., 2008; Vaz-de-Lima et al., 2008; Hofgaard et al., 2009).

Materials i reactius

- Solució fisiològica (115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 13.8 mM glucosa, pH 7,2).
- Solució fisiològica sense CaCl₂.
- Lucifer Yellow, 457 Da (LY) (Molecular Probes).
- Dextrà Alexa Fluor 568, 10 kDa (Molecular Probes).

- Camera d'imatge (SA-OLY/2, Warner Instruments).
- Octanol (Sigma).

Procediment

El procés es realitza a temperatura ambient

1. S'incuben les cèl·lules, sembrades en cubre-objectes rodons de 12 mm, 10 min. en la solució fisiològica. Es munta el cubre-objectes a la cambra d'imatge de manera que les cèl·lules estiguin disposades cara amunt, i s'afegeix 500 µl de solució fisiològica sense CaCl₂ que conté LY 2 mg/ml o dextrà 1 mg/ml pel control negatiu de no-difusió. Pel control negatiu d'inhibició de les unions *gap*, es fa el mateix procediment, però les solucions fisiològiques utilitzades contenen octanol 600 µM.
2. En presència del colorant, i amb l'ajuda d'un bisturí, es realitza un tall en la monocapa de cèl·lules en el centre del cubre-objectes, deixant incubar 10 min amb el LY, d'aquesta manera el tall permet l'entrada del colorant dins les cèl·lules ja que la ruptura de la cèl·lula provoca una ràpida vesiculació de la membrana plasmàtica.
3. Es fan 3 rentats amb la solució fisiològica sense calci i es mesura la fluorescència a 488 nm pel LY i a 568 nm pel dextrà.

4.3. MONITORITZACIÓ DEL VOLUM PER FLUORESCÈNCIA

Existeixen diferent tècniques per mesurar els canvis en el volum cel·lular, que es poden agrupar en 2 categories: (i) les mesures òptiques o electrofisiològiques, les quals monitoritzen els canvis en la concentració de substàncies introduïdes dins les cèl·lules; i (ii) les tècniques basades en els mètodes morfomètrics, les quals inclouen reconstruccions tridimensionals de seccions o mesures dels canvis en una o dues dimensions.

Aquesta part del treball s'ha basat en la tècnica no invasiva de mesura òptica dels canvis de concentració de colorants fluorescent atrapats dins les cèl·lules, com el Fura-2 o la Calcein, o usant proteïnes fluorescents.

4.3.1. Monitorització del volum cel·lular amb calceina

La calceina AM (Invitrogen) és un marcador fluorescent que s'excita a 485 nm i emet a 530 nm (verd). Les modificacions en els àcids carboxilics de la molècula amb esters acetoximetilics (AM) provoquen que la molècula perdi la càrrega i pugui penetrar en la membrana cel·lular. Un cop a dins la cèl·lula, la calceina (no fluorescent) és hidrolitzada per esterases endògenes resultant una molècula negativa fortament carregada que queda retinguda en el citoplasma cel·lular. La fluorescència de la calceina no està afectada pels canvis fisiològics en el pH, Ca²⁺ o Mg²⁺ intracel·lular, i això ens proporciona una millor relació senyal/fons.

Usant aquesta tècnica es pretén mesurar els canvis en la intensitat de fluorescència que són proporcionals als canvis de concentració del marcador, que a la vegada són inversament

proporcionals als canvis de volum d'aigua cel·lular (Crowe et al., 1995, Ford et al., 2005, Comes et al., 2006).

Materials i reactius:

- Tampó fisiològic: 122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg aigua.
- Tampó hipoosmòtic: 60 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 180 mOsm/kg aigua.
- Tampó hiperosmòtic: 122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 500 mOsm/kg aigua ajustat amb sacarosa.
- Osmometre (Vapor Pressure Osmometre, WESCOR).
- Cambra d'imatge (SA-OLY/2, Warner Instruments).
- Sistema de perfusió.
- Microscopi (Olympus DSU spinning-disk).
- Software d'adquisició Cell-R (Olympus).
- Calceina (Invitrogen).
- Cèl·lules sembrades en cubre-objectes.

Procediment:

Les cèl·lules que s'utilitzen en aquest mètode són astròcits primaris de rata diferenciats, els quals prèviament s'han infectat amb els AdVs corresponents a l'experiment. Aquesta tècnica ens permet obtenir les dades del volum cel·lular, la permeabilitat osmòtica de l'aigua i de la regulació del volum cel·lular dels astròcits. També fa possible la visualització dels canvis morfològics cel·lulars en les diferents condicions.

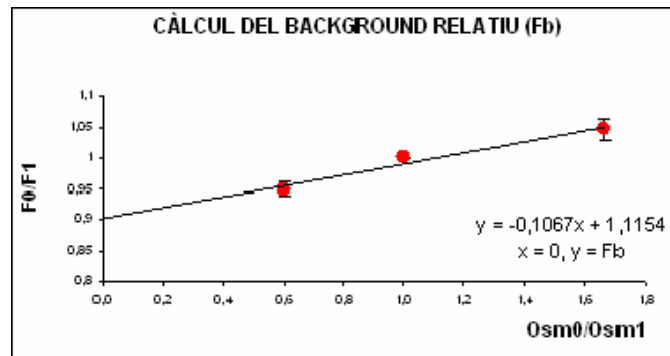
1. Es renten les cèl·lules 5 min amb el tampó fisiològic i seguidament, es carreguen incubant 10 min amb tampó fisiològic 2 µM Calceina (es controla el nivell de fluorescència amb el microscopi).
2. Es fan 2 rentats amb el tampó i es munta el cubre-objectes amb les cèl·lules cara amunt la cambra d'imatge, de manera ràpida evitant que les cèl·lules s'assequin. Aleshores s'instal·la el sistema de perfusió.
3. Es regula el flux de perfusió amb el tampó fisiològic (50 µl/seg) i, un cop estabilitzat, es procedeix a fer les mesures de fluorescència. Primer, s'enfoca el pla de les cèl·lules a 488 nm, i un cop dissenyat el programa d'adquisició de fotos a diferents temps, es comença l'experiment.

El primer pas, va ser observar com es comportava el volum cel·lular dels astròcits en presència de les solucions osmòtiques. Els paràmetres que ens interessava conèixer per tenir informació de les alteracions provocades en els astròcits, quan sobreexpressàvem o inhibíem MLC1, en els xocs osmòtics eren:

- F_b = background relatiu. Es calcula realitzant una recta de regressió en la gràfica F_0/F_1 vs ΔOsm , en la qual F_b és el valor on la recta talla l'eix de les y (gràfica 1).

F_0 = fluorescència temps 0
 F_1 = fluorescència temps 1
 $\Delta Osm = Osm_0/Osm_1$,
 gradient osmòtic

Gràfica 1. Gràfica de la fluorescència vs. el gradient osmòtic per calcular el background relatiu (F_b).



- Transformar la intensitat de fluorescència en el volum d'aigua cel·lular relatiu (V/V_0):

$V/V_0 = (F_1 / F_0) + f_b / 1 + f_b$, amb aquest valor es pot fer la gràfica V/V_0 vs temps.

- Càlcul de la constant de temps exponencial (b): es calcula amb els valors inicials obtinguts quan s'aplica la condició hipoosmòtica (fórmula exponencial de 3 paràmetres):

$y = y_0 + a(1 - e^{-bx})$, on b = temps exponencial

- Càlcul de la permeabilitat osmòtica de l'aigua $P_f = V_0 / b \times \text{àrea cel} \times \Delta Osm \times V_w$ (cm/seg), on V_0 és el volum inicial i V_w és el volum molar parcial de l'aigua = 18 cm³/mol.

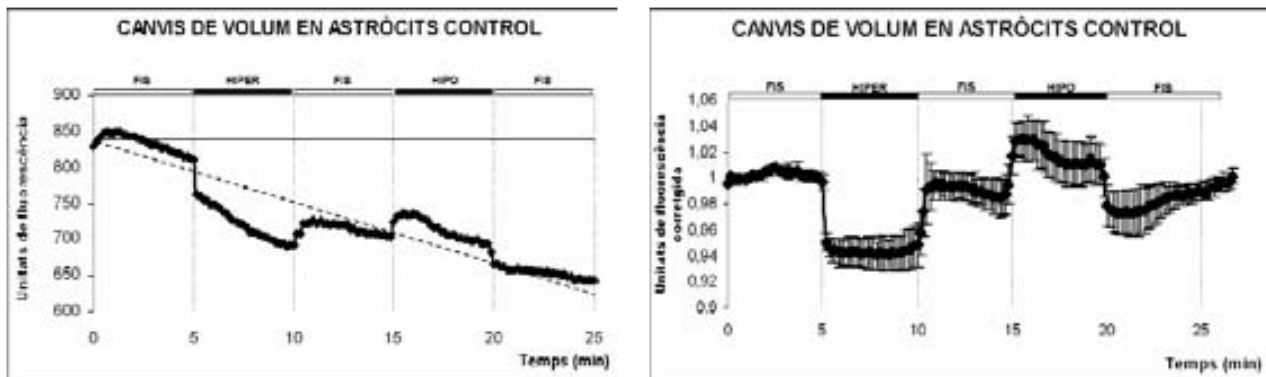
- Càlcul del RVD associat a la resposta volumètrica cel·lular a un xoc hipoosmòtic:

$RVD = ((V / V_0)_{\max} - (V / V_0)_1 / (V / V_0)_{\max} - 1) \times 100$, on $(V / V_0)_{\max}$ és el valor màxim de V/V_0 i $(V/V_0)_1$ és el valor de V/V_0 per a cada temps.

Un aspecte a tenir en compte era el *fotobleaching* de la calceïna degut a que les repetides exposicions provocaven una caiguda progressiva de la fluorescència. En la gràfica de l'esquerra (gràfica 2) es pot observar la línia discontinua que representa la caiguda de la fluorescència. Amb les imatges obtingudes del microscopi es calcula la cinètica d'intensitat de fluorescència per a una regió d'interès (ROI) determinada per a cada temps. Amb aquestes dades es construeix la gràfica i s'aplica la fórmula més adequada per tal de corregir els valors. Un cop corregits, la gràfica (dreta) presenta el perfil recte.

Com es pot observar en la gràfica 2 (dreta), el perfil que obteníem era el contrari del que ens esperàvem, ja que quan les cèl·lules quan s'encongien per la sortida d'aigua (hiperosmòtic), el fluoròfor es concentrava hi hauria d'augmentar la fluorescència. En aquesta mateixa línia, quan les cèl·lules s'inflaven per l'entrada d'aigua (hipoosmòtic), el fluoròfor s'hauria de diluir i hauria de disminuir la fluorescència. Aquest fenomen era degut a que la calceïna en astròcits es compartimentalitzava i experimentava *self-quenching*, provocant l'efecte contrari: quan els

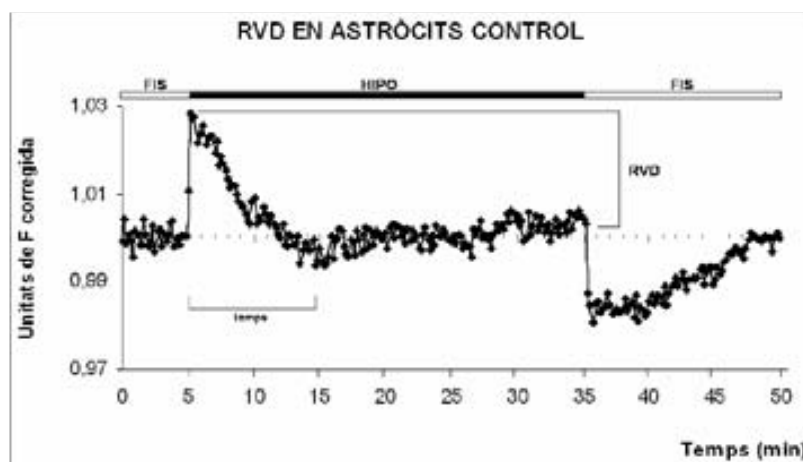
astròcits s'encongien per les condicions extracel·lulars d'hiperosmolaritat, disminuïa la fluorescència i a la inversa, en condicions d'hiposmolaritat, els astròcits s'inflaven però la fluorescència augmentava (Ford et al., 2005; Solenov et al., 2004; Hamann et al., 2002).



Gràfica 2. Perfils de fluorescència de la calceïna en astròcits sotmesos a diferents condicions osmòtiques. Esquerra, perfil de les dades de fluorescència de la calceïna que experimenta *fotobleaching*. Dreta, perfil de fluorescència de la calceïna corregit, amb les desviacions estàndard de $n=3$.

Aquesta tècnica ens permetia l'estudi en els canvis de volum dels astròcits i per tant, la recuperació del volum inicial (RVD) en condicions d'hiposmolaritat. Per comprovar el temps que necessitaven els astròcits per recuperar el volum inicial, primer, es va fer un tractament a temps llargs amb les solucions hiposmòtica i fisiològica per estudiar el RVD. El tractament que es va aplicar va ser: 5 min en solució fisiològica, 30 min en solució hiposmòtica i 15 min en solució fisiològica, adquirint imatges cada 15 seg. La gràfica 3 mostra que els astròcits necessitaven ~10 min per recuperar el seu volum inicial (RVD) després d'aplicar la solució hiposmòtica, i posteriorment, 15 min per recuperar el volum després d'aplicar la solució fisiològica.

Un cop establert el temps de RVD dels astròcits, les condicions experimentals aplicades van ser de: 5 min en sol. fisiològica, 15 min en sol. hiposmòtica i 15 min en sol. fisiològica.



Gràfica 3. Perfil de fluorescència de la calceïna en astròcits control per estudiar la recuperació del volum (RVD) en condicions hiposmòtiques.

4.3.2. Monitorització de la fluorescència del sensor de Cl⁻ YFP-H148Q en condicions de xoc osmòtic

El sensor de clorur YFP-H148Q/I152L (*yellow fluorescent protein*) és una proteïna mutada amb una elevada sensibilitat a l'ió Cl⁻ a pH fisiològic (Jayaraman et al., 2000). S'utilitza com a indicador de Cl⁻ / hal·lurs cel·lulars, ja que la seva fluorescència és sensible als anions de manera: F⁻ ~ ClO₄⁻ > I⁻ > SCN⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > Cl⁻. L'intercanvi Cl⁻/I⁻ és un protocol usat generalment en assajos de fluorescència de la conductància del CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ja que es pot monitoritzar la caiguda de la fluorescència en presència de I⁻, que és del 30-40%. En aquest estudi, aquesta tècnica ens permet observar, de manera visual-quantitativa, si hi ha alteracions en l'entrada/sortida de Cl⁻/I⁻ de la cèl·lula en presència o absència de les proteïnes d'estudi, i també ens permet calcular la permeabilitat de l'aigua.

Materials i reactius:

- Tampó fisiològic: 122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg aigua.
- Tampó hipoosmòtic: 60 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 180 mOsm/kg aigua.
- Tampó fisiològic de I⁻: 122 mM NaI, 3.3 mM KI, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg aigua.
- Tampó hipoosmòtic de I⁻: 60 mM NaI, 3.3 mM KI, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 180 mOsm/kg aigua.

Procediment:

El procediment és similar al descrit en l'apartat anterior però amb algunes modificacions: els astròcits diferenciats, sembrats en cubre, es transfecten amb el sensor YFP-H148Q/I152L i 24h després s'infecten amb els diferents AdVs. Es deixen 1 setmana i es procedeix amb el mètode. Les cèl·lules es renten amb el tampó fisiològic i es munten a la cambra d'imatge. S'apliquen les diferents solucions per cada protocol ((A) 1 min fisiològic Cl⁻, 1 min fisiològic I⁻ i 1 min fisiològic Cl⁻; (B) 1 min fisiològic I⁻, 1 min hipoosmòtic I⁻). L'adquisició de les fotos es fa excitant a 488 nm i amb un filtre de 527 nm d'emissió.

4.4. MESURA DEL FLUX DE SORTIDA CEL·LULAR DEL D-H³-ASPARTAT

El dany cerebral durant estats patològics és parcialment degut a la sortida d'aminoàcids excitatoris (EAAs), com el L-glutamat i el L-aspartat, que provoquen la mort neuronal. Està ben descrit que els astròcits capten aquests aminoàcids. En condicions patològiques, els astròcits s'inflen deixant sortir els EAAs com la taurina, l'aspartat i el glutamat, entre d'altres, com a part del procés de regulació del seu volum (RVD). En aquest apartat es descriu un mètode per estudiar el RVD dels astròcits *in vitro* en presència d'una solució hipotònica, utilitzant l'aminoàcid D-aspartat marcat radioactivament amb triti (H³) (Kimmelberg et al., 1990). El triti emet raigs β febles, la seva vida mitja és de 12,3 anys i el rang en aire de 6 mm. Per això està considerat un isòtop no perillós, atès que

es genera de manera espontània, tot i això, es treballa amb el material, les condicions i les instal·lacions apropiades a les dependències de la instal·lació radioactiva (IR-2105) del campus de Ciències de la Salut de Bellvitge.

Materials i reactius:

- Solució fisiològica: 122 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg d'aigua.
- Solució hipoosmòtica: 60 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₂, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.2, 180 mOsm/kg d'aigua.
- Solució fisiològica de càrrega: sol. fisiològica complementada amb 100 µM àcid D-aspartic (Fluka) i àcid 5µCi D-[1,3-H³]-aspàrtic (1 mCi/ml, activitat específica 11,3 Ci/mmol, Perkin Elmer).
- Sala de cultius radioactius.
- Comptador de centelleig.
- Vials i líquid de centelleig (Ecoscint H, National Diagnostics).
- Solució de llisi: 100 mM NaOH, 0.1% SDS.
- BCA (Pierce).
- Osmòmetre (Vapor pressure osmòmetre, Wescor).
- Inhibidors: Tamoxifen (Sigma T9262).

Procediment:

A. Control de càrrega: abans de començar, s'ha de fer un control de càrrega del tipus cel·lular amb el qual es treballarà, en aquest cas seran astròcits diferenciats, per tal d'optimitzar el temps necessari perquè les cèl·lules captin el màxim de radioactivitat. Les mostres es faran per triplicat.

1. Els astròcits es sembren en plaques de 24 pous i es deixen diferenciar 3 setmanes amb Ara-C.
2. Es fan 3 rentats amb la solució fisiològica atemperada a 37°C.
3. S'afegeixen 500 µl de la solució de càrrega a cada pou i es deixa incubar a diferents temps 0, 1, 6, 14 i 24h a l'incubador a 37°C.
4. Es renten 3 vegades les cèl·lules amb la solució fisiològica.
5. Es llisen els astròcits amb 100 µl de la solució de llisi, pipetejant fins que desaparegui el moc. S'afegeix una al·lquota de 50 µl en els vials amb 3 ml de líquid de centelleig, i 10 µl serveixen per valorar la proteïna de amb el kit de BCA.
6. Es posen els vials al comptador de centelleig per obtenir les comptes per minut (CPM) amb el programa del 3H 1 min.

Un cop tenim el temps òptim, que serà de 6h, es procedeix amb l'experiment.

B. Sortida d'aspartat en condicions hipoosmòtiques

S'ha de tenir en compte que, per a cada grup d'astròcits a estudiar, hi ha d'haver triplicats per a les diferents condicions. En aquest cas seran condicions fisiològiques i hipoosmòtiques.

1. Es renten els astròcits 3 cops amb la solució fisiològica.
2. S'afegeixen 500 µl per pou de la solució de càrrega i s'incuba durant 6h a l'incubador a 37°C.

3. A les 6h, es fan 3 rentats amb la solució fisiològica i s'afegeixen 300 µl/pou de la solució fisiològica, amb o sense inhibidor, o 300 µl/pou de la solució hipoosmòtica, amb o sense inhibidor. S'agafen aliquotes de 20 µl del medi a diferents temps: 0, 1, 2.5, 5, 10 i 20 min. Per últim, s'agafa la resta de medi i es llisten les cèl·lules amb 100 µl de la solució de llisi.
4. Les aliquotes de 20 µl, la resta de medi i 70 µl del llistat es posen en els vials amb 3 ml de líquid de centelleig i es compten les CPM. Es valora la proteïna de 10 µl de llistat amb BCA.

La suma de les CPM de les aliquotes de 20 µl, la resta de solució i el llistat (sempre tenint en compte el volum inicial) servirà per saber la càrrega total d'aquella mostra, per així poder fer el percentatge de sortida d'aspartat respecte el total de càrrega. Es normalitza per la concentració de la proteïna per comprovar que la càrrega és homogènia entre les mostres del mateix grup i entre els grups.

5. APÈNDIX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL

AMPICIL·LINA

Es dissol l'ampicil·lina en aigua MilliQ a 100 mg/ml, es filtra a 0.22 µm i es guarda al·liquotada a -20°C. Una vegada descongelada, es manté en gel. S'ha de tenir en compte que l'ampicil·lina s'inactiva a temperatures superiors a 55°C. Es treballa a 100 µg/ml.

CLORAMFENICOL

Es dissolen 25 mg/ml de metanol i es guarda al·liquotada a -20°C. La concentració de treball és de 25 µg/ml.

ECL

Es preparen les solucions d'àcid coumàric a 90 mM i Luminol a 250 mM ambdues amb DMSO, protegides de la llum, i es guarden a -20°C.

Es prepara la solució A (50 ml: 5 ml Tris 1M pH 8.5, 45 ml aigua, 110 µl àcid coumaric 90 mM, 250 µl luminol 250 mM) i la solució B (1ml: 100 µl H₂O₂ al 30% i 900 µl d'aigua). Les solucions es conserven a 4°C tapades de la llum. La barreja de ECL es fa amb una relació 1ml sol. A + 15 µl sol. B.

EDTA 0,5M (àcid etilen-diamino-tetra-acètic)

Es dissol 90.3 g d'EDTA en aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8 amb NaOH (la solució passa de tèrbola a transparent).

ESTREPTOMICINA

Es dissolen 50 mg/ml d'aigua Milli-Q i s'aliquota a -20°C. Es treballa a 30 µg/ml.

HEPES 1M (Hepes: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid)

Es pesen 119 g en 500 ml d'aigua milliQ, s'ajusta el pH a 7.4 i es filtra. Es conserva a 4°C.

IPTG 1M

Es pesen 9.532 g d'IPTG en 40 ml d'aigua MilliQ i després es filtra amb un filtre de 20 µm. Es fan al·liquotes d'1 ml i es guarden a -20°C.

KANAMICINA

Es dissolen 25 mg/ml d'aigua Milli-Q i s'aliquota a -20°C. Es treballa a 25 µg/ml.

MEDI LB, LB-AGAR

Es dissol en aigua destil·lada, 1% triptona, 0.5% extracte de llevat, 1% NaCl i s'autoclava. En el cas de preparar LB-agar, s'afegeix l'agar (1.5% en pes) al LB, just abans d'autoclavar-lo. Es deixa refredar fins a 50°C i s'hi afegeix l'antibiòtic (si és necessari). S'omplen les plaques de petri i es deixa solidificar a temperatura ambient. Es guarden a 4°C en posició invertida.

PBS 10x

Es dissol en aigua destil·lada, 1.36 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄ i s'ajusta pH a 7.4 amb HCl. Si el PBS 1x és per als cultius, s'autoclava.

PBS²⁺

En el PBS s'afegeix 1 mM CaCl₂ i 1 mM Mg(SO₄)₂

PARAFORMALDEHID (PFA) 3% EN PBS

Cal manipular el PFA sempre sota campana perquè és molt tòxic. Per 500 ml, es pesen 15 g de paraformaldehid en un vas de precipitats de vidre. En un altre vas s'escalfa 400 ml H₂O MilliQ fins a uns 60°C. Es barreja l'aigua calenta sobre el vas amb el PFA, en un agitador. Quan està dissolt es tiren 2-3 gotes de NaOH 1 N fins que la solució quedi transparent. Es deixa refredar i s'afegeix 50 ml PBS 10x. Es fan alíquotes i es congelen a -20°C.

SOC

Per 1l es dissolen 20 g triptona, 5 g extracte de llevat, 0.5 g NaCl, 2.5 ml KCl 1M, 20 ml glucosa 1M. S'afegeix aigua destilada fins a 1l i s'autoclava.

TAMPÓ D'ELECTROFORESI 10X

Tris base 250 mM, glicina 1.91 M, SDS 1%.

TAMPÓ DE CÀRREGA LSB 4X

8% SDS, 200mM tris-HCl pH6.8, 0.04% brillant blue, 40% glicerol (si és necessari, s'afegeixen agents reductors: 1-10% β-Mercaptoetanol o 100mM DTT).

TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA 10X

Tris base 250 mM, glicina 1,92 mM, pH 8.3.

TBS-T 10X

Es dissol en aigua destil·lada, 1.35 M NaCl, 30 mM KCl, 250 mM Tris-HCl, i s'ajusta a pH de 7.4. Posteriorment, s'afegeix l'1% de Tween-20 i s'agita suaument fins que quedi dissolt.

TAE

Es dissol en aigua destil·lada, 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, i s'ajusta a pH 8.0.

TETRACICLINA

Es dissolen 5 mg/ml ETANOL 70% i s'aliquota a -20°C. Es treballa a 12,5 µg/ml.

TRIS 1M (2-Amino-2(hydroxymethyl)-1-3propanediol)

Es pesen 60,5 g en 500 ml d'aigua milliQ, s'ajusta al pH desitjat i es filtra.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1. MODEL DE RATOLÍ *KNOCK-OUT* CONDICIONAL DE *Mlc1*

El primer objectiu d'aquesta tesi va ser el disseny i l'obtenció d'un model animal de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC), indispensable per a l'estudi de la fisiopatologia de la malaltia. El grup va decidir generar un ratolí *knock-out* (KO) condicional de *Mlc1*. El fet que fos condicional ens aportava un seguit d'avantatges. D'una banda, evitar una possible letalitat embrionària, d'altra banda, poder estudiar el defecte de la proteïna MLC1 de manera específica de teixit o en diferents estadis del desenvolupament, i d'aquesta forma intentar reproduir els diferents fenotips presents en els pacients de MLC.

1. DISSENY DE L'ESTRATÈGIA

Es va començar amb un estudi detallat del gen *Mlc1* de ratolí i de la regió on estava localitzat en el genoma. Es va analitzar la zona del promotor i la regió de l'intró entre els exons 3-4, per assegurar-nos que els elements introduïts posteriorment no interferissin en l'expressió normal del gen. Un cop estudiada la regió del gen, es va procedir a dissenyar l'estratègia (figura 23).

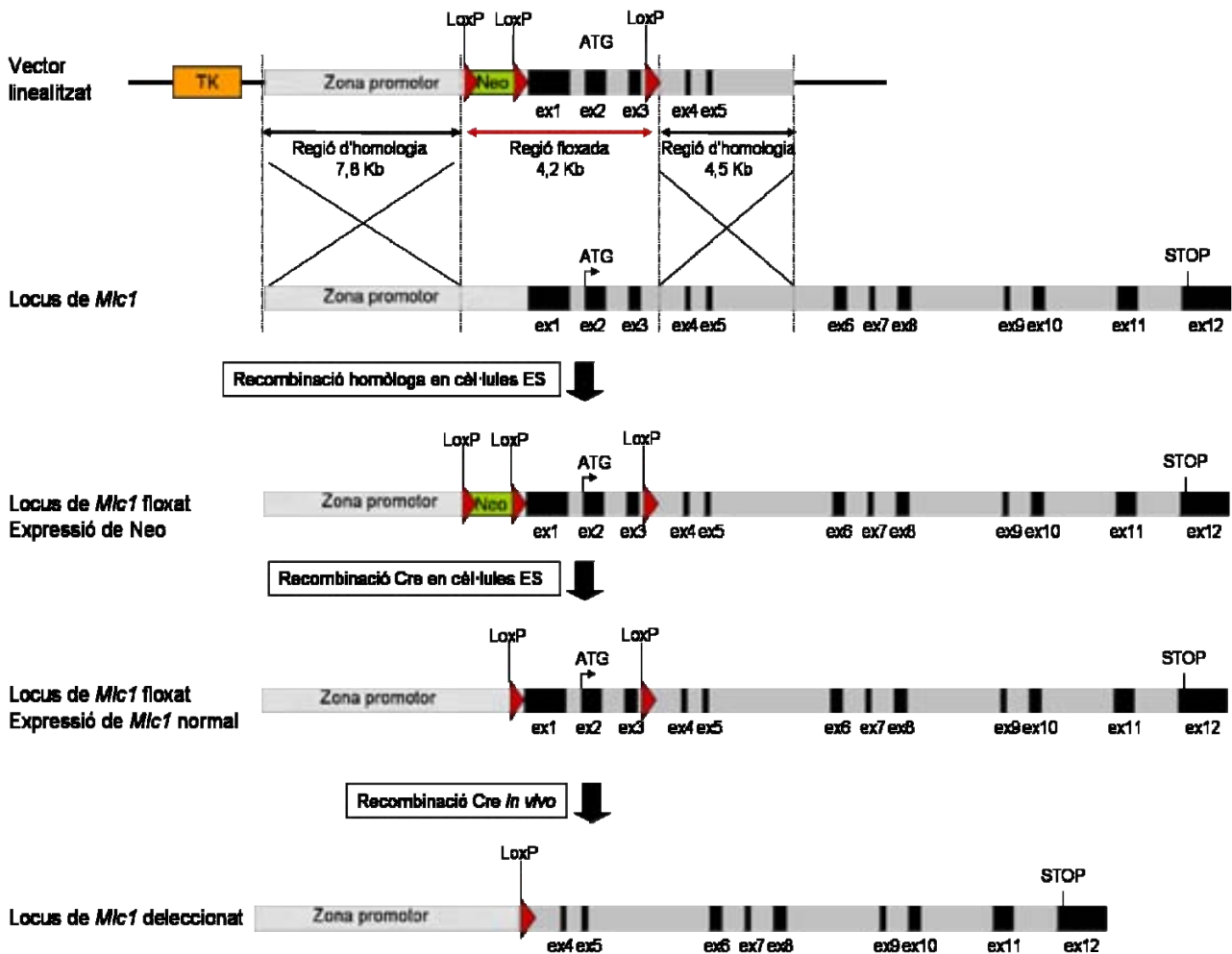


Figura 23. Esquema del disseny que es va seguir per l'obtenció del vector de recombinació i per la generació del ratolí KO condicional de *Mlc1*. En el vector linealitzat es representa el gen de resistència *timidina quinasa* (TK) en taronja. A la zona del promotor hi ha el gen de resistència *Neomicina* (Neo) (verd) flanquejat per les seqüències de *loxP* (triangles vermells), i un altre *LoxP* en l'intró 3-4. Les regions d'homologia (de 7.8 i 4.5 kb) permeten la recombinació homòloga del vector modificat amb el locus de *Mlc1* de les cèl·lules ES (*embryonic stem cells*). El gen Neo permet la selecció positiva de les cèl·lules ES que han incorporat la regió d'interès, mentre que el gen de la TK permet la selecció negativa d'aquelles cèl·lules que han patit recombinacions inespecífiques.

L'estratègia que es va dissenyar, es va basar en el sistema Cre-LoxP (Bouvier and Cheng, 2009; Sauer, 1998). Va consistir en introduir una seqüència LoxP a l'intró 3-4 de *Mlc1*, i el gen de resistència *Neomicina* (Neo), floxat amb dos LoxP, a la zona del promotor. El vector final s'hauria recombinat, gràcies a les regions d'homologia (de 7,8 i 4,5 kb), amb el locus de *Mlc1* en les cèl·lules ES (*embryonic stem cells*). El gen Neo permetria la selecció positiva d'aquelles cèl·lules ES que haurien incorporat la regió d'interès, després de la recombinació. El vector també contenia el gen de resistència *Timidina quinasa* (TK), en un extrem de les regions d'homologia, fet que permetria la selecció negativa degut a les recombinacions no homòlogues. Mitjançant la recombinació gràcies a la recombinasa Cre, les cèl·lules ES que l'haguessin eliminat el gen Neo i que mantinguessin els dos LoxP, s'injectarien a l'embrió a l'estadi de blàstula per obtenir el ratolí KO condicional. Un cop obtingut el ratolí, mitjançant el creuament amb ratolins transgènics que expressessin Cre, s'obtindria el ratolí KO de *Mlc1*.

2. CONSTRUCCIÓ DEL VECTOR DE RECOMBINACIÓ

Mitjançant les bases de dades de CHORI i USCS Genome Browser, es van seleccionar diferents BACs que acotaven la regió del gen *Mlc1*. Un cop estudiats els mapes de restricció, es va seleccionar el BAC més adequat (RP23-114I6), del qual es va subclonar la regió d'interès en el vector pBeloBAC11. A partir d'aquest vector, es va procedir a la construcció del vector de recombinació, utilitzant la tècnica de clonació per recombinació ET (figura 24). A tots els gens i als fragments se'ls hi va introduir, per PCR, les seqüències homòlogues (50 bp) a la regió on s'havien d'insertar. Aquestes regions portaven incorporades unes dianes de restricció determinades, que permetien obtenir un patró de bandes específic.

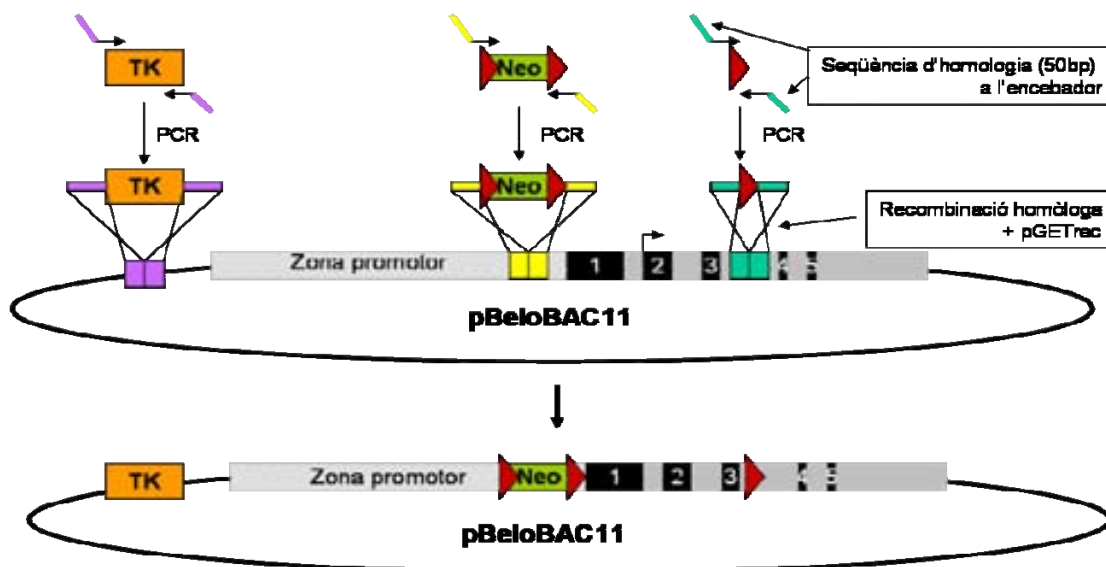


Figura 24. Esquema dels passos necessaris per a la construcció del vector de recombinació. Es representa la zona del promotor del gen *Mlc1* i els exons 1-5 (negre) corresponents al DNA genòmic, subclonat del BAC al vector pBeloBAC11. Tant en el gen *Timidina quinasa* (TK), com en el gen de la *Neomicina* (Neo), floxat per dos loxP (triangles vermells), com en el LoxP, se'ls hi introdueix, per PCR, les seqüències homòlogues al lloc on s'han d'insertar, representades amb lila, groc i blau, respectivament. Els productes de PCR es recombinen amb el vector mitjançant el pGETrec, en la soca DH10B.

Cada pas de recombinació implicava que els DNAs s'havien d'electroporar a la soca DH10B, que contenia el plàsmid pGETrec, el qual promovia la recombinació. Posteriorment, calia extreure el DNA per començar una nova recombinació. La introducció de les seqüències LoxP no havia d'interferir en l'*splicing* o en la traducció, ja que els ratolins modificats havien de tenir una expressió del gen *Mlc1* normal, els quals posteriorment, s'havien d'utilitzar com a controls.

Durant el primer any de tesi, es va estar treballant en el disseny i la construcció del vector de recombinació necessari per generar el KO condicional. Degut a la complexitat del mètode, es va decidir externalitzar el procés a una empresa especialitzada, com l'ICS (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg). Conjuntament amb l'empresa, i després d'estudiar varies possibilitats, es va decidir que la millor estratègia era la d'introduir les seqüències LoxP flanejant els exons 2 i 3, ja que era en l'exó 2 on hi havia el codó d'inici de la traducció (figura 25).



Figura 25. Esquema de l'estratègia que l'empresa ICS ha seguit per generar el ratolí *knock-out* condicional de MLC1. En negre es representen els exons, amb el codó d'inici de la traducció (ATG) a l'exó 2 i el codó d'aturada (STOP) a l'exó 12. Les dues seqüències LoxP es representen amb triangles vermells, situats a l'intró 1-2 i 3-4, amb una distància entre ells de 0.6 kb. El casset FRTNeoFRT es representa amb un triangle taronja,

L'avantatge d'aquesta estratègia era que el fragment entre les dues seqüències LoxP media 0.6 kb, fet que afavoria la recombinació dels dos LoxP i l'escissió dels exons 2 i 3. El desavantatge era que es podria produir un pèptid de 379 aminoàcids amb l'inici de transcripció a l'exó 1 (CTGGTT ATG C, comparat amb la seqüència consens Kozak).

3. DISCUSSIÓ

Actualment, s'han obtingut els ratolins KO totals de *Mlc1*, els quals no presenten letalitat embrionària. El grup està en els primers passos de caracterització d'aquests ratolins. Estan programades diferents aproximacions experimentals per caracteritzar el model de MLC, a diferents nivells: perfil bioquímic de varis ions i molècules (analitzats en sang i en el fluid cerebroespinal); biologia i fisiologia cel·lular del CN; histologia de diferents òrgans a diferents estadis del desenvolupament; anàlisi per ressonància magnètica d'imatge; aspectes fisiològics com el pes, la temperatura corporal, tremolors, la megalencefàlia; i aspectes del comportament, com la coordinació motora, l'equilibri, l'orientació espacial, etc.

RESULTATS CAPÍTOL 2: CARACTERITZACIÓ DE MLC1 HUMÀ

Anteriorment, en el grup, es van generar 4 anticossos contra diferents parts de la proteïna MLC1 de ratolí (Teijido et al., 2004; Teijido et al., 2007), amb els quals es va caracteritzar l'expressió durant el desenvolupament del ratolí. Cap d'ells, però, detectaven la proteïna humana. Amb la finalitat de tenir més eines per entendre la fisiopatologia de la Leucoencefalopatia Megalencefàlica amb quists subcorticals (MLC) en humans, es van generar tres nous anticossos contra la proteïna humana. En aquest capítol de resultats, s'explica l'obtenció d'aquests anticossos, la seva purificació i la caracterització de l'expressió de la proteïna humana MLC1, tant en mostres control, com en mostres de diferents patologies. Els teixits humans adults van ser cedits pel Banc de Teixits de l'Hospital de Bellvitge, en col·laboració amb el Dr. Isidre Ferrer (UB-IDIBELL), i les mostres fetals van ser cedides per l'Hospital Vall d'Hebrón.

1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA LA PROTEÏNA MLC1 HUMANA

Utilitzant els serveis de l'empresa Eurogentec (Bèlgica), es van generar 3 anticossos policlonals en conill contra la proteïna humana MLC1. L'anticòs contra l'extrem amino terminal-GST (denominat Nt) va ser produït per l'Oscar Teijido. El primer pas, va ser purificar-lo per afinitat amb una columna on s'hi va acoblar l'extrem N-terminat de forma covalent (figura 21, materials i mètodes). També es van generar dos anticossos contra dos pèptids de l'extrem N-terminal (N4 i N5), que corresponen a la mateixa regió que els pèptids utilitzats per produir els anticossos contra la proteïna de ratolí, els quals havien donat un bon resultat. Aquest dos anticossos es van purificar utilitzant cromatografia d'afinitat amb els pèptids units a una columna (figura 19, materials i mètodes). Un cop purificats es van testar per Western Blot (WB), immunocitoquímica (ICQ), immunohistoquímica (IHQ) en teixit congelat, immunoprecipitació (IP) i microscopia electrònica (EM). A la taula següent es fa un resum de la funcionalitat de cada anticòs.

Anticòs	WB	ICQ	IHQ	IP	EM
Nt	+++	++	+	-	NT
N4	+++	+++	+++	+++	+++
N5	+	+	++	-	++

Taula 3. Resum dels resultats de cada anticòs en les diferents tècniques testades. (+++, molt adequat; ++, adequat; +, regular; -, no adequat; NT, no testat).

Les diferents proves van mostrar que l'anticòs N4 era el més adequat per treballar, ja que funcionava bé en totes les tècniques. Malgrat això, s'han utilitzat els tres anticossos en diferents experiments. A continuació es presenten uns exemples de la caracterització dels anticossos per les diferents tècniques.

Els dos anticossos purificats N4 i N5 es van provar per WB (figura 26A) comparant-los amb els sèrums pre-immunes. Les mostres utilitzades van ser extractes de cèl·lules HeLa no transfectades (com a control negatiu), transfectades amb la proteïna humana MLC1 i un homogenat de teixit de cervell humà. Es pot observar que els anticossos purificats N4 i N5 detectaven la banda de ~37 kDa i la de ~72 kDa (asteriscs), mentre que els sèrums pre-immunes no les detectaven. També s'observava que l'anticòs N5 era menys específic, ja que hi apareixien d'altres bandes (fletxes).

La IP es va realitzar amb un teixit de cervell humà control. Les diferents fraccions de la IP es van analitzar per WB, amb el mateix anticòs amb el qual es va immunoprecipitar, ja que aquest quedava unit a la reina després de l'elució. La figura 26B, corresponent a la IP amb l'anticòs N4, mostrava l'extracte total solubilitzat (ET), el sobrenedant (SN) que contenia la fracció de proteïna no unida, i l'eluit (E) corresponent a la fracció de proteïna unida. Aquí s'observa que la immunoprecipitació de MLC1 va ser del 90%. Com a control, es va utilitzar una reina bloquejada amb BSA, on es pot veure que no hi ha hagut interaccions inespecífiques (en l'eluit).

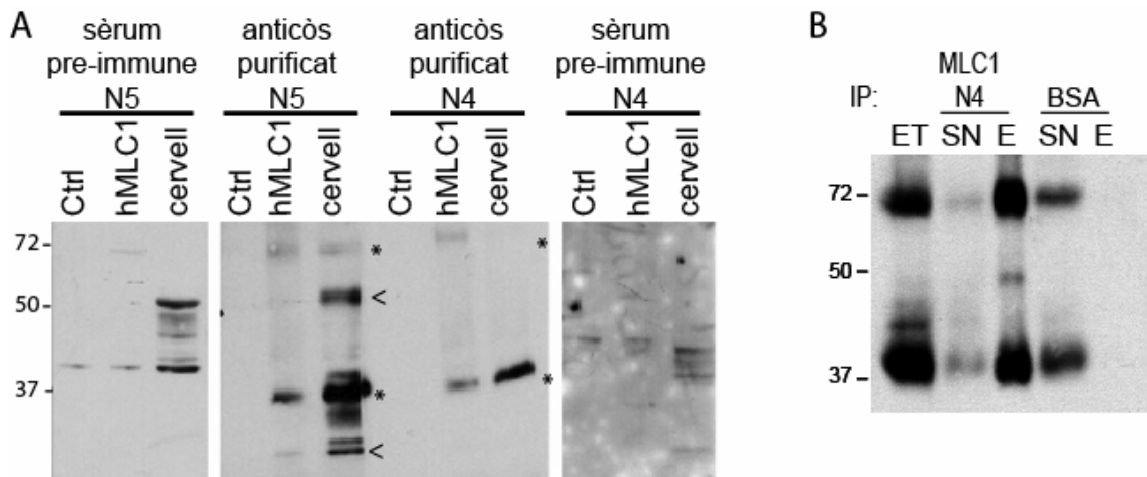


Figura 26. Prova dels anticossos MLC1 N4 i N5 per WB i IP. (A) WB detectant la proteïna humana MLC1 tant amb el sèrums pre-immunes de l'anticòs N4 i N5, com amb els anticossos N4 i N5 purificats a una dilució 1/100 (50 µg proteïna/carril). (Ctrl: HeLa no transfectades; hMLC1: HeLa transfectades amb el plàsmid MLC1 humà). (B) WB de la IP amb l'anticòs N4 d'un extracte de teixit de cervell humà. La immunoprecipitació de MLC1 és d'un 90% aprox, en l'eluit, mentre que no s'observen unions inespecífiques en l'eluit del control amb BSA. (ET:extracte total; SN:sobrenedant; E:eluit).

Es van provar aquests mateixos anticossos en mostres de teixit de ratolí, i es va veure que l'anticòs N4 també reconeixia la proteïna murina.

Es van realitzar immunohistoquímiques en teixit humà congelat, fent servir mostres de cerebel, escorça i estriat, amb l'anticòs Nt. Les imatges mostren un marcatge a fibres corresponents als tractes axonals a cerebel, i una senyal intensa a astròcits al voltant dels vasos sanguinis, a escorça i a estriat (figura 27). Resultats similars es van obtenir amb els anticossos N4 i N5 (no mostrats).

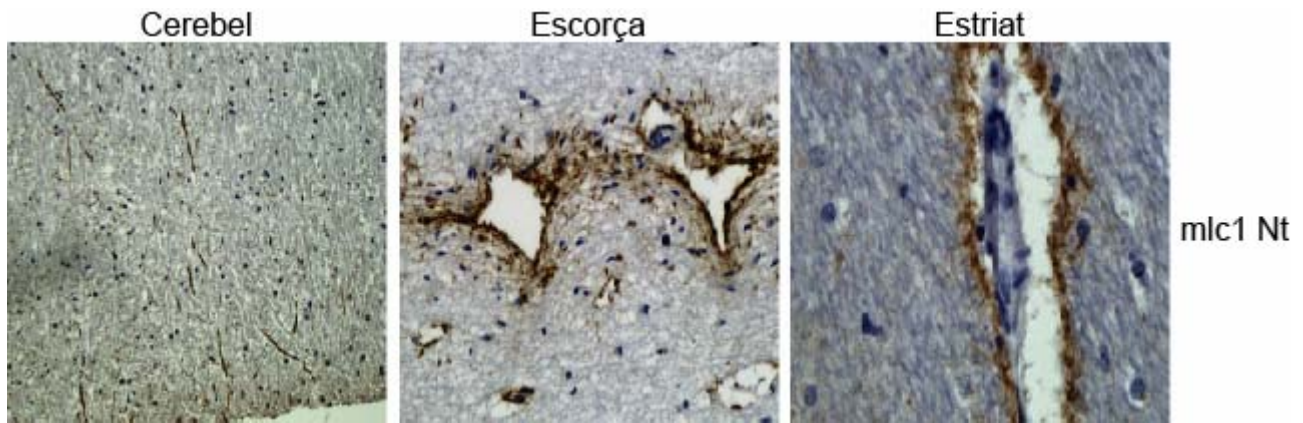


Figura 27. Immunohistoquímica de teixit humà amb l'anticòs MLC1 Nt (1:50) per DAB. La marca de MLC1 es localitza a fibres axonals a cerebel (esquerra); i en astròcits perivasculars al voltant dels vasos sanguinis en escorça (mig) i estriat (dreta).

En col·laboració amb el Dr. Albert Martínez (UB), es va realitzar un marcatge d'*immunogold* per microscopia electrònica en teixit humà. Les partícules d'or de 18 nm, unides als l'anticòs N4 i N5, van localitzar la proteïna MLC1 en unions entre astròcits com es pot veure en la imatge corresponent a l'anticòs N5 (fletxes, figura 28).

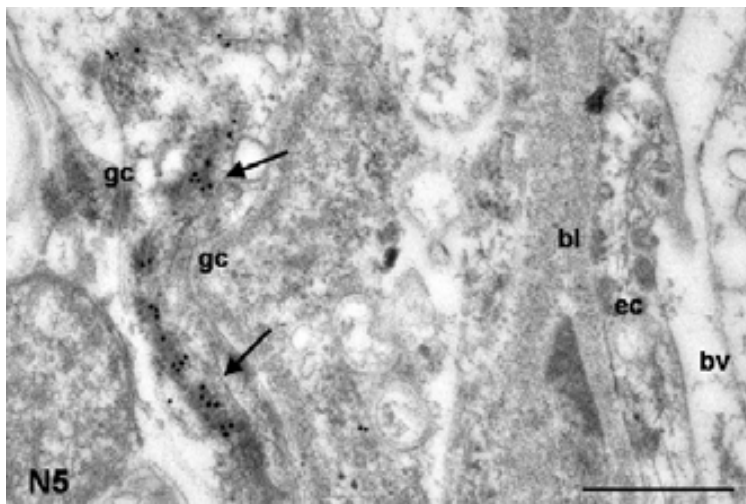


Figura 28. Imatge de microscopia electrònica en teixit de cervell humà on es mostren el marcatge de l'anticòs N5 unit a partícules d'or de 18 nm. La localització de MLC1 es detecta en unions entre dos astròcits (gc, cèl·lula glial; bl, làmina basalt; ec, cèl·lula endotelial; bv, vas sanguini). Barra, 500 nm.

2. EXPRESSIÓ DE MLC1 EN DIFERENTS TEIXITS HUMANS

A diferència de l'expressió de MLC1 en ratolí, l'expressió de la proteïna en humans no estava tant ben definida. Això ens va portar a fer un estudi en diferents teixits humans. Per començar es va fer una recerca informàtica (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0027/>), la qual ens va donar informació de l'expressió del gen *MLC1* (*KIAA0027*) en diferents teixits humans. Detectaven alts nivells del RNA missatger per RT-PCR-ELISA i Northern-Blot a diferents parts del sistema nerviós central i a leucòcits de sang perifèrica, i nivells més baixos a fetge fetal, melsa, pulmó i ovari. Amb aquestes dades, es va voler comprovar l'expressió de la proteïna en alguns d'aquest teixits humans, corresponents a un pacient control (A07-146) (figura 29). Detectàvem el senyal de la proteïna MLC1 majoritàriament a cervell (cv) i a nervi òptic (n.o.), mentre que a nervi raquidi sacre

o cua de cavall (cua), pulmó (pul), melsa (mel) i ovari (ov) no s'hi detectava. Al fetge, es detectava una banda d'un pes molecular més elevat, però s'haurien de fer més estudis per determinar si era inespecífica o podria correspondre a MLC1 amb alguna modificació post-traducciona.

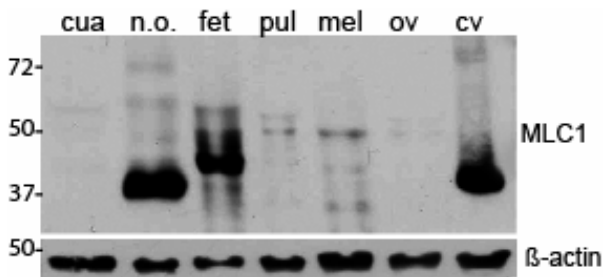


Figura 29. WB de diversos teixits humans (50 µg proteïna) on es detecta MLC1 amb l'anticòs N4 (1:100) (cua: cua de cavall; n.o.: nervi òptic; fet: fetge; pul: pulmó; mel: melsa; ov: ovari; cv: cervell). L'actina s'utilitza com a control de càrrega (1:10000).

Aquests resultats ens van indicar que MLC1, igual que passa en ratolí, té una expressió bàsicament a sistema nerviós, per això els estudis posteriors es centren en aquest teixit.

3. DISTRIBUCIÓ DE MLC1 EN DIFERENTS REGIONS DEL CERVELL HUMÀ

3.1. MLC1 en cervell humà adult

El següent pas va ser fer un estudi detallat de l'expressió de la proteïna MLC1 en diferents regions del cervell humà adult, d'un pacient control (A07-44). Les mostres corresponents a diferents regions del cervell i SNP eren: hipocamp, tàlam, estriat, cerebel, protuberància, escorça frontal i parietal, medul·la i retina. Es pot observar que MLC1 s'expressava a totes les regions estudiades amb una expressió superior a l'hipocamp, el cerebel, l'escorça i la medul·la (figura 30).

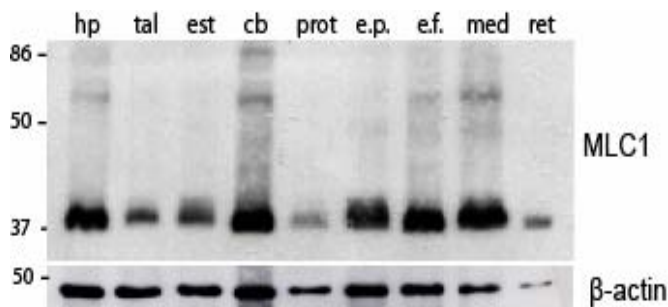


Figura 30. WB de les diferents regions del cervell humà (50 µg proteïna) detectant la proteïna MLC1 humana amb l'anticòs N4 (dilució 1:100) (hp: hipocamp; tal: tàlam; est: estriat; cb: cerebel; prot: protuberància; e.p.: escorça parietal; e.f.: escorça frontal; med: medul·la; ret: retina). L'actina s'usa com a control de càrrega (1:10000).

3.2. MLC1 en cervell humà fetal

Ens vam preguntar si en el desenvolupament del cervell humà, hi havia algun canvi en el patró d'expressió de MLC1, per això es va fer un estudi similar a l'anterior amb mostres de teixit de cervell fetal humà. Les mostres corresponents a hipocamp, escorça, cerebel, medul·la i ull procedien d'un fetus control de 14,5 setmanes. El WB mostra que en estadis prematurs del fetus (figura 31, A), hi ha una major expressió a medul·la i a cerebel, en comparació amb hipocamp i escorça, segurament degut a l'expressió de MLC1 en neurones, ja que en aquest moment del desenvolupament, els astròcits estan en una fase immadura. També es va detectar una lleugera expressió a ull. En aquestes mateixes mostres es van fer immunohistoquímiques, realitzades per

la Dra. Marisol Montolio. La doble IF mostrava que MLC1 (verd) colocalitzava amb NF-200 (vermell) en la mostra de medul·la (B). D'aquesta manera es va comprovar que MLC1 s'expressava a neurones en aquest estadi del desenvolupament.

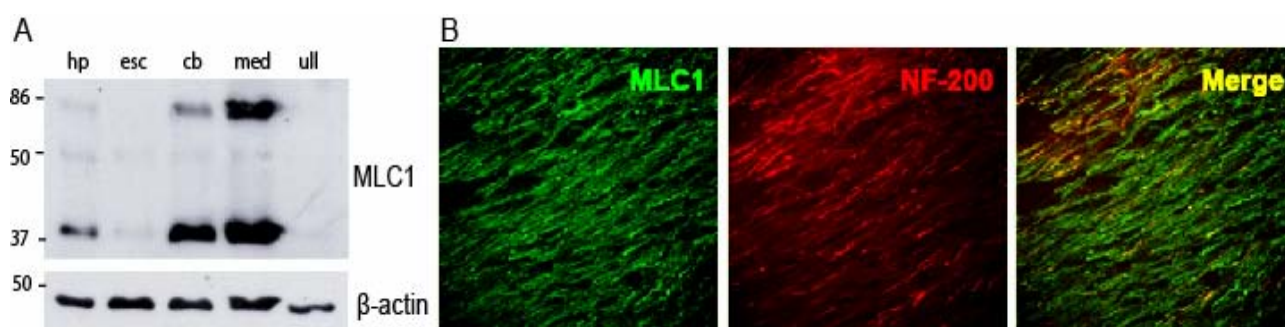


Figura 31. Expressió de MLC1 a cervell fetal humà. (A) WB de les diferents regions del cervell fetal detectant la proteïna MLC1 humana amb l'anticòs N4 (1:100) (50 µg proteïna) (hp: hipocamp; esc.: escorça; cb: cerebel; med: medul·la) L'actina s'usa com a control de càrrega (1:10000). (B) Doble immunohistoquímica entre MLC1 (verd) i NF-200 (vermell) en medul·la humana fetal.

4. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE MLC1 RELACIONAT AMB DIFERENTS PATOLOGIES EN HUMANS I EN RATA

Per obtenir informació sobre quins processos patològics podrien estar relacionats amb MLC1, es van fer un seguit d'aproximacions en diferents patologies del sistema nerviós en humans i en rata. Aquestes patologies tenien relació amb estats alterats dels astròcits i de les neurones, per poder veure si variava l'expressió de MLC1 en algun cas. En col·laboració amb el Dr. Isidre Ferrer (UB-IDIBELL), es van obtenir mostres (1) d'un model de rata d'epilèpsia induïda per àcid kainic, per comprovar si MLC1 estava implicat en aquest procés ja que alguns pacients de MLC presenten atacs epilèptics; (2) mostres de processos tumorals humans (glioblastomes), per veure si MLC1 estava implicat en el cicle cel·lular i en la proliferació dels astròcits; i (3) mostres d'infart cerebral humà, on s'expressa la glia reactiva.

4.1. Model de rata epilèptica induïda per àcid kainic

Aquest model consisteix en l'administració sistèmica en rates adultes d'àcid kainic, un anàleg cíclic del glutamat, neurotransmissor excitatori majoritari i una potent neurotoxina. El mecanisme pel qual l'àcid kainic indueix l'epileptogènesi i neurotoxicitat encara és parcialment desconegut. Aquest model és similar a l'epilèpsia de lòbul temporal humana (Sommer et al., 2001).

Es van estudiar mostres de cervell i cerebel d'una rata model d'epilèpsia a 0 (control), 1, 3, 6 i 24h després del tractament amb àcid kainic. Com es mostra en la figura 32, la variació en els nivells d'expressió de MLC1 no era significativa en les rates tractades amb àcid kainic respecte el control, ni a cervell (A) ni a cerebel (B).

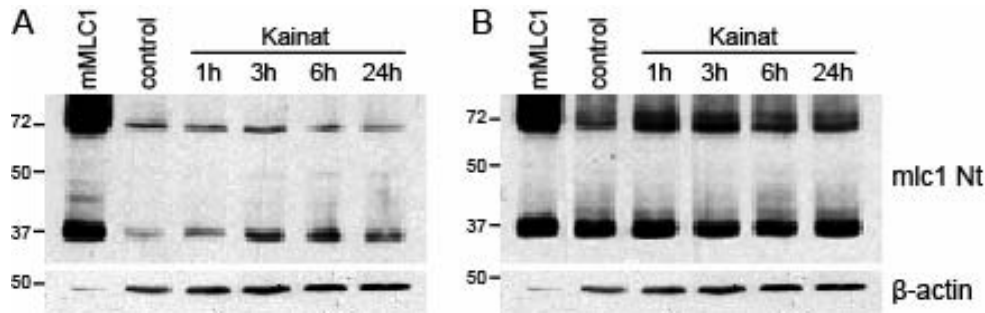


Figura 32. Expressió de MLC1 en el model de rata d'epilèpsia induïda per àcid kainic. Mostres de cervell (A) i de cerebel (B) procedents de rates no tractades (control) o tractades durant 1, 3, 6 i 24h amb àcid kainic. Els nivells d'expressió de MLC1 detectats amb l'anticòs Nt (1:100) no varien respecte el control. Com a control positiu s'ha utilitzat extractes de cèl·lules HeLa transfectades amb MLC1 de ratolí (mMLC1), i com a control de càrrega, l'actina.

4.2. Expressió de MLC1 en glioblastomes humans

Els glioblastomes (OMIM 137800) són neoplàsies intracranials del SNC, on les cèl·lules majoritàriament afectades són els astròcits. Es classifiquen, en funció les seves característiques histològiques, en: grau I, grau II (astrocitomes de baix grau), grau III (anaplàsia difusa i elevat potencial proliferatiu a glioblastoma maligne) i grau IV (glioblastoma multiforme agressiu) (Mineo et al., 2002). Ja que MLC1 s'expressa en astròcits, es va fer l'estudi en aquests tumors per comprovar si els nivells de la proteïna MLC1 estaven alterats. Les mostres emprades corresponien a 8 glioblastomes grau IV de la OMS i 8 controls, resumits en la taula 4.

Controls	Sexe	Edat	Glioblastoma	Sexe	Edat
A02-15	D	49	835	D	72
A03-19	H	35	851	D	76
A03-25	D	65	861	D	50
A03-34	H	53	829	D	69
A05-5	H	58	878	H	56
A05-58	H	54	884	D	48
A05-149	H	55	900	D	60
A07-9	H	59	890	H	80

Taula 4. Dades de les mostres de teixit control i glioblastomes, on s'especifica el sexe del pacient i l'edat.

Es va observar (figura 33) que els glioblastomes 800, 890, 829 i 878 semblaven tenir una expressió similar al control, mentre que en els 861, 851 i 835 apareixia un augment en l'expressió de la proteïna. Estudis histològics van revelar que aquests 3 glioblastomes presentaven una elevada angiogènesi (no mostrats). L'astrocitoma 884, en canvi, presentava uns nivells baixos de MLC1 comparat amb els controls.

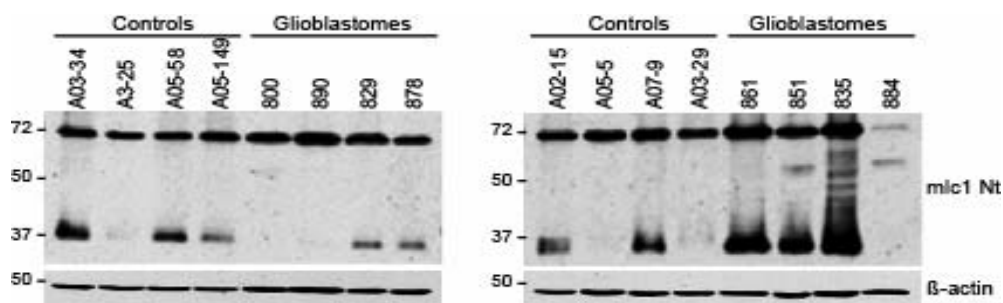
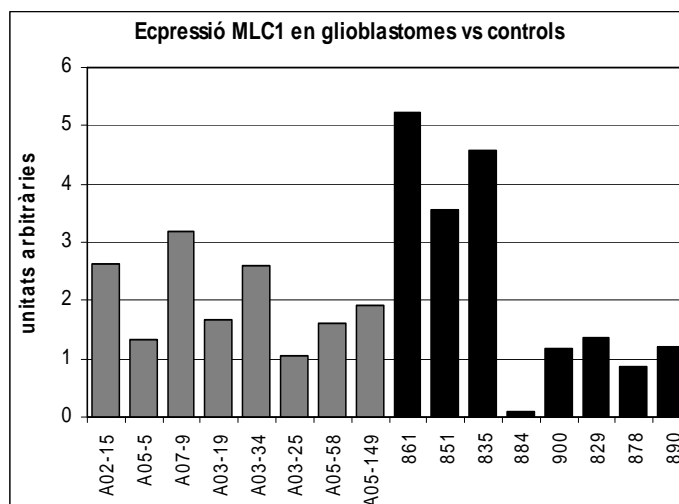


Figura 33. WB on es mostren 4 controls i 4 glioblastomes diferent a cada gel, on es detecta la proteïna MLC1 amb l'anticòs Nt. Com a control de càrrega s'ha utilitzat l'actina.

Es van fer les quantificacions de les bandes, representades en la gràfica 4 (sumant les intensitats de les bandes corresponents al monòmer i al dímer, normalitzades per l'actina, amb el software Quantity One (Bio Rad)), on s'observaven els resultats anteriorment mencionats.

Gràfica 4. Representació de la quantificació de la intensitat de les bandes del WB. (En gris, mostres control i en negre, glioblastomes).



L'increment de l'expressió de MLC1 en els glioblastomes més vascularitzats ens suggereix que MLC1 podria estar incrementat degut a la major presència d'astròcits perivasculars, però no es pot concloure que tingui un paper important en la tumorigènesi.

4.3. Expressió de MLC1 en infarts cerebrals humans

L'infart cerebral és un procés d'isquèmia, on una fallada en la irrigació sanguínia provoca la mort cel·lular d'una part de la massa encefàlica. Al voltant de la zona infartada, hi ha una zona de penombra on s'activa la glia reactiva (Paciaroni et al., 2009). Les mostres que es van fer servir eren de 3 pacients amb infart cerebral (A06-139 i A06-156 amb infarts aguts, i A07-143 amb infart subagut).

Com es mostra a la figura 34 (A), es va detectar una disminució de l'expressió de MLC1 en la zona de l'infart (I) i un augment de l'expressió a la zona de penombra (P, fletxes), en comparació amb el control, corresponent a la mateixa zona de l'altre hemisferi cerebral no afectat (C). La sobreexpressió de la proteïna MLC1 detectada a la zona de penombra podia ser deguda a la glia reactiva o a la presència de neurones desmielinitzades.

Per respondre a aquesta pregunta, es va fer immunohistoquímica en el teixit de penombra, realitzada per la Dra. Marisol Montolio, i es va observar que MLC1 es detectava en fibres neuronals (figura 34, B). Les dobles immunofluorecències amb marcadors neuronals (NF-200 i MBP) mostraven l'expressió de MLC1 en fibres axonals, com es pot observar en la colocalització amb NF-200 (C), però no presentava la mateixa localització que MBP (D), proteïna específica de la mielina.

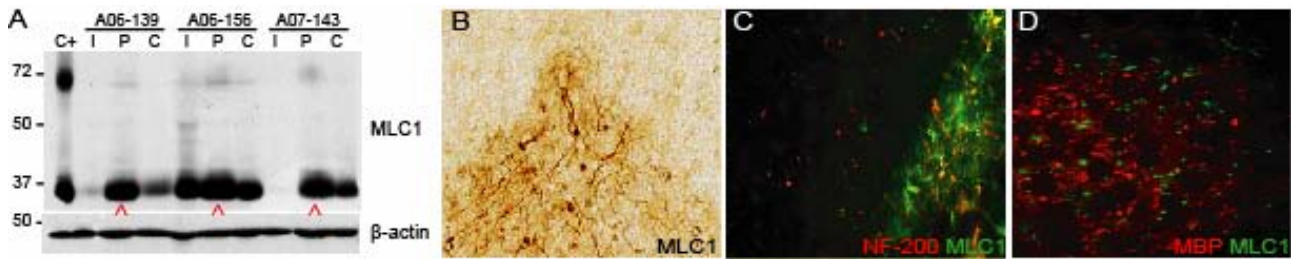


Figura 34. Expressió de MLC1 en infarts cerebrals humans. (A) WB de 3 mostres d'infart cerebral on s'ha usat l'anticòs N4 per detectar els nivells d'expressió de MLC1, que són més alts en la zona de penombra (fletxes). C+: extractes de cèl·lules HeLa transfectades amb hMLC1; I: infart; P: penombra; C: control. Com a control de càrrega s'ha usat l'actina. Immunohistoquímiques de teixit d'infart cerebral humà corresponent a la zona de penombra. (B) La tinció per DAB de MLC1 N4 mostra expressió de MLC1 a fibres axonals. (C) Dobles immunofluorecències amb MLC1 (verd) i NF-200 (vermell) on es pot observar un cert grau de colocalització, mentre que amb MBP (D) (vermell) no mostra colocalització.

5. DISCUSSIÓ

Gràcies a la generació d'aquests anticossos, hem estat capaços de detectar la proteïna MLC1 en mostres humanes, amb un marcatge específic a fibres neuronals i a astròcits perivasculars, concretament en unions astrocitàries. Aquests resultats concorden amb la localització prèviament descrita en ratolí (Teijido et al., 2007).

Els estudis en teixit humà ens van indicar que MLC1 té una expressió bàsicament a sistema nerviós, amb un patró d'expressió que varia durant el desenvolupament. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de MLC1, en etapes fetals, correspon a l'expressió de la proteïna a neurones, mentre que en l'etapa adulta, l'expressió predominant de MLC1 és astrocitària, com passa en ratolí (Teijido et al., 2004; Teijido et al., 2007).

Les dades de les diferents patologies ens han mostrat que, MLC1, no presenta canvis en la seva expressió en condicions d'hiperplàsia astrocitària ni en condicions de glia reactiva. Però si que s'ha observat un augment de l'expressió de la proteïna a la zona de penombra envoltant la zona infartada, corresponent a axons neuronals al voltant de la lesió, els quals es troben desmielinitzats. Aquests resultats suggereixen que els canvis en l'expressió de MLC1 detectats a neurones i produïts per lesió, poden estar regulats per la mielinització.

CAPÍTOL 3. MODELS CEL·LULARS PER A L'ESTUDI DE MLC1.

Amb l'objectiu de trobar un model cel·lular per a l'estudi de la patofisiologia de MLC1, en aquest capítol, es descriuen les condicions i característiques de dos cultius cel·lulars primaris que expressen endògenament MLC1: el model astrocitari i el model neuronal.

1. RECERCA D'UNA LÍNIA CEL·LULAR QUE EXPRESSI MLC1 ENDÒGENAMENT

Degut a la dificultat per obtenir mostres de pacients, es va intentar buscar una línia cel·lular que expressés MLC1 de manera endògena. Es van provar diferents línies cel·lulars relacionades amb la glia o amb els limfòcits, com les línies humanes de glioblastoma-astrocitoma (U-51, U-87MG i T98G), les línies de neuroblastomes (SK-N-JD, LA1-55N, LA1-5S i SH-5YSY), la línia de glioma vascular de rata C6 i la línia 5 de gangli retinal de rata (RGC5, no mostrat), els limfoblast-T (Jurkat) i els limfoblast-B (TK6) humans.

Es mostren els resultats de les diferents línies (figura 35, A-C), on no es va poder detectar la proteïna MLC1 ni a les línies U251, U87, T98G (A), Jurkat ni TK6 (B). (C) En les línies de neuroblastomes SK-N-JD, LA1-55N, LA1-5S i SH-5YSY, es detectaven unes bandes de pes molecular al voltant de 37 i 70 kDa, que podrien correspondre a MLC1, i una banda a ~50 kDa, però la seva intensitat era tant baixa comparat amb el control, que es van descartar com a models cel·lulars.

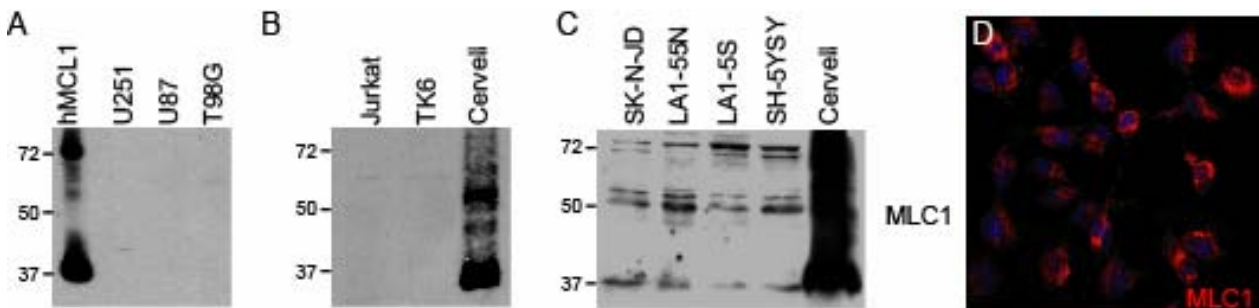


Figura 35. Estudi de l'expressió de MLC1 en diferents línies cel·lulars amb l'anticòs N4 (1:100). (A) MLC1 es detecta a cèl·lules HeLa transfectades amb el plàsmid que codifica per MLC1 humana, mentre que no es detecta cap banda a les línies U251, U87 i T98G. (B) Tampoc es detecta la proteïna a la línia Jurkat ni a la TK6 (cervell humà com a control), i (C) en les línies SK-N-JD, LA1-55N, LA1-5S i SH-5YSY es detecten unes bandes a ~37, 50 i 70 kDa amb una baixa intensitat en comparació amb el control (cervell). (D) Immunocitoquímica del cultiu cel·lular U251 on es detecta la proteïna MLC1 (en vermell) amb l'anticòs N4 (1:100) i nuclis (en blau) tenyits amb Dapi.

També es va intentar detectar MLC1 en la línia U251 per immunocitoquímica amb els diferents anticossos disponibles, ja que el grup de la Dra. Elena Ambrosini (Roma) l'utilitzen per fer estudis de MLC1 (Ambrosini et al., 2008; Lanciotti et al., 2010). En la figura 35 (D), es mostra la immunofluorescència amb l'anticòs N4, on es pot observar un marcatge de MLC1 (en vermell) nuclear i perinuclear distribuït en un puntejat. En no poder detectar la proteïna per WB, vàrem pensar que el marcatge observat per IF era inespecífic, ja que tampoc presentava la localització a

membrana descrita en teixits. Un marcatge similar va donar la immunofluorescència de la línia RGC5 (no mostrat).

2. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL D'ASTRÒCITS PRIMARIS DE RATA I EXPRESSIÓ DE MLC1

Es va triar el model animal de rata per obtenir els cultius primaris, concretament d'escorça i d'hipocamp, on hem vist que MLC1 té més expressió. Encara que, paral·lelament, es van posar a punt les condicions del cultiu d'astròcits humans i de ratolí, aquest últim necessari per a la caracterització del model de ratolí *knock-out* condicional de MLC1.

2.1. Caracterització del model d'astròcits de rata

El primer pas va ser caracteritzar la proteïna MLC1 en els cultius d'astròcits d'escorça i d'hipocamp, tant els nivells d'expressió com de localització d'aquesta. Com es pot observar en el WB (figura 36, A), on es van comparar els nivells d'expressió de MLC1 entre escorça i hipocamp, l'expressió era superior a hipocamp comparada amb escorça, i augmentava amb el temps en cultiu. Per estudiar la localització per IF (B), els astròcits van ser sembrats a dues confluències diferents, a baixa densitat (a) i a alta densitat (b). Les imatges mostraven un marcatge citoplasmàtic difús en les dues densitats, mentre que el senyal era més intens en el cultiu confluent (b).

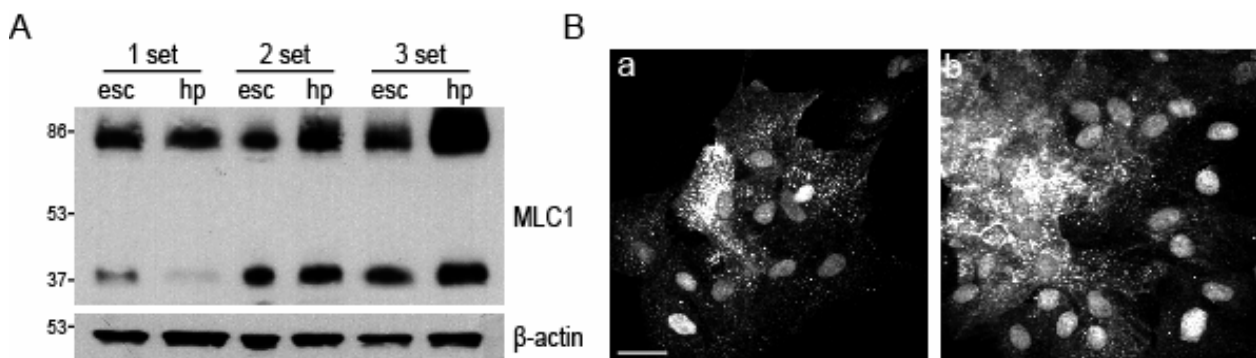


Figura 36. Expressió de MLC1 en el cultiu d'astròcits primaris de rata. (A) Nivells d'expressió de MLC1 detectats per WB amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí (1:100) en cultius d'astròcits d'escorça i d'hipocamp a 1, 2 i 3 setmanes en cultiu. El nivell d'expressió augmenta en el temps, i és major en hipocamp. L'actina s'usa com a control de càrrega (50 μ g proteïna/carril). (B) Localització de MLC1 en un cultiu d'astròcits d'hipocamp a baixa densitat (a) i a alta densitat de cèl·lules (b), on es pot observar un senyal de la MLC1 difús en el citoplasma (anti-MLC1 1:50). Barra, 20 μ m.

Aquests resultats suggerien que l'expressió de MLC1 s'incrementava amb més temps en cultiu, però la localització de la proteïna no concordava amb la localització descrita *in vivo* a la membrana plasmàtica. Ens vam preguntar si la seva localització i expressió depenien de la diferenciació cel·lular, de l'estat de quiescència o de la presència de neurones. Per tal d'estudiar aquesta qüestió, es van utilitzar diferents agents químics que induïen la parada de cicle a la fase G0/G1, com la cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) o la Uridina/Fluouridina. Vam estudiar un altre

agent que induïa la diferenciació cel·lular cap a un fenotip de glia reactiva, com el dibutiril AMP cíclic (dB-AMPC). També es van obtenir cultius mixtos d'astròcits i de neurones d'hipocamp.

Els astròcits van ser sembrats amb o sense presència de neurones, i es van parar amb els diferents compostos durant 1, 2 i 3 setmanes. L'expressió de MLC1 va ser analitzada per WB, com es mostra en la figura 37 (astròcits tractats amb Ara-C). Com es pot observar, l'expressió de MLC1 augmentava com més temps estaven els astròcits en cultiu, i la presència de neurones incrementava els nivells de la proteïna.

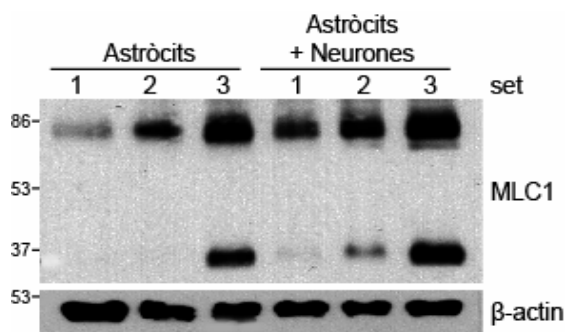


Figura 37. WB on es mostra l'expressió de MLC1 en extractes de cultius d'astròcits i cultius mixtos amb neurones en presència d'Ara-C a 1, 2 i 3 setmanes en cultiu. El nivell d'expressió de MLC1 augmenta amb el temps i s'incrementa en presència de neurones. La proteïna va ser detectada amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí (1:100), i l'actina va ser usada com a control de càrrega.

Seguidament, es va procedir a l'estudi de la localització de MLC1 en aquests dos tipus de cultius per immunocitoquímica. Els cultius d'astròcits i els cultius mixtos van ser tractats amb Ara-C durant 1, 2 i 3 setmanes. Les imatges de la IF (figura 38) mostren que en el cultiu d'astròcits (A-C), el senyal de MLC1 era difús en el citoplasma a 1 setmana (A). A les 2 setmanes (B) es començava a observar la presència de MLC1 a les unions entre astròcits i el marcatge de MLC1 disminuïa a citoplasma. A les 3 setmanes (C) la localització de MLC1 era majoritàriament a la membrana, en els processos astrocitaris. En el cultiu mixt amb neurones (D-F), trobem el mateix resultat però amb petites diferències. A 1 setmana (D), les unions entre astròcits ja estaven més desenvolupades i MLC1 estava més localitzat en aquests processos. A les 2 setmanes (E), el marcatge ja era majoritàriament a membrana, i a les 3 setmanes (F), podíem observar uns processos més llargs i ramificats, on el senyal de MLC1 era molt intens. També es va estudiar l'expressió de MLC1 en aquests cultius mixtos a baixa i a alta densitat (G i H, respectivament). Les imatges del cultiu a baixa densitat (G) mostren un baix nivell d'expressió de MLC1 en astròcits aïllats, només detectada en auto-processos (fletxes), mentre que en el cultiu a alta densitat (H), MLC1 es localitzava al llarg de tota la membrana plasmàtica en contacte entre astròcits. Resultats similars es van obtenir amb els astròcits tractats amb Uridina/Fluouridina (no mostrat).

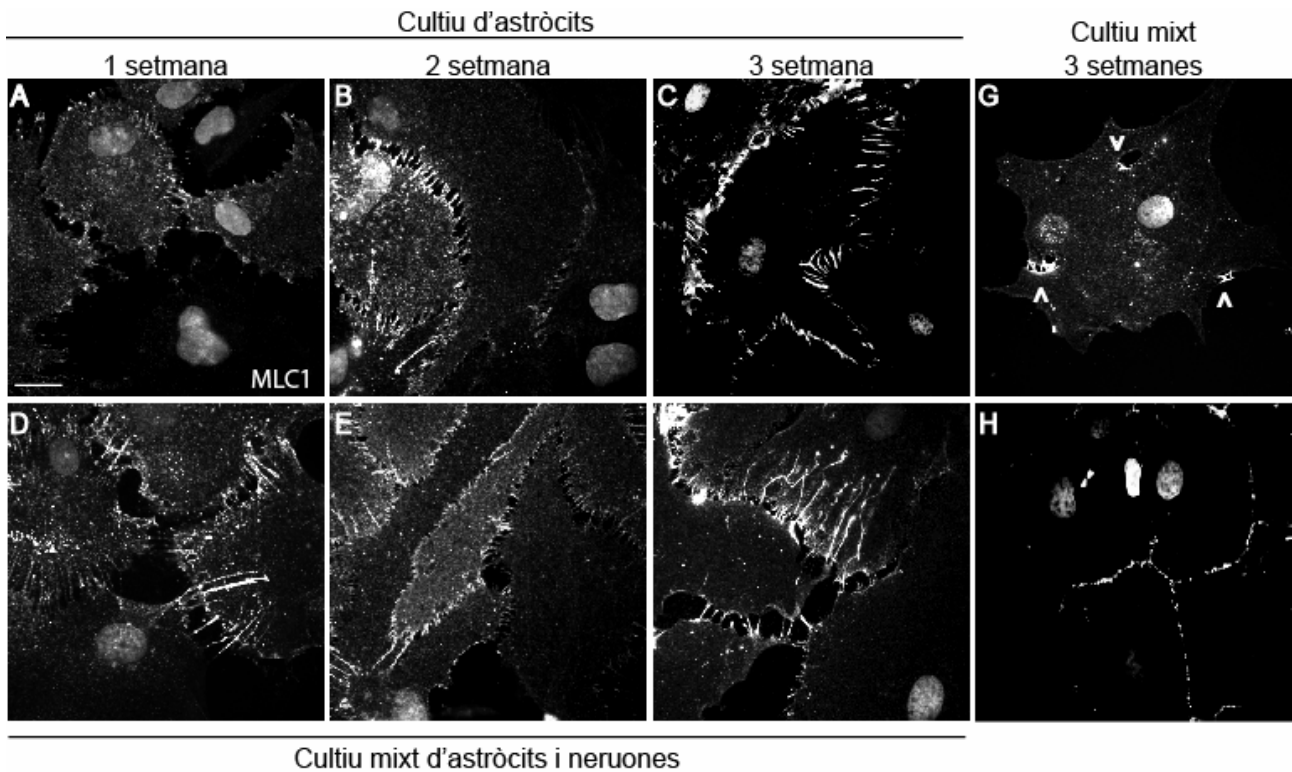


Figura 38. Localització subcel·lular de MLC1 en diferents condicions de cultiu d'astròcits primaris d'hipocamp de rata per immunocitoquímica amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí (1:50). (A-C) Cultiu d'astròcits tractats amb Ara-C (20 μ M) durant 1, 2 i 3 setmanes respectivament, on es mostra una localització citoplasmàtica de MLC1 a 1 setmana (A), l'aparició d'unions entre astròcits i la localització progressiva a MLC1 a membrana a partir de les 2 setmanes (B) sent completa a les 3 setmanes (C). (D-F) Localització de MLC1 en les mateixes condicions anteriors en un cultiu mixt d'astròcits i neurones, on s'observa una localització més ràpida a membrana de MLC1 a 1 setmana (D) i uns processos astrocitaris més desenvolupats a les 2 i 3 setmanes (E i F, respectivament). (G) Cultiu mixt a baixa densitat, on la detecció de MLC1 és bàsicament a auto-processos en astròcits aïllats, i en cultius confluents (H) els senyals de MLC1 és a tota la membrana plasmàtica, en contacte amb els astròcits veïns. Barra, 20 μ m.

Aquests resultats suggerien que la proteïna MLC1, en aquest model astrocitari, estava localitzada en les unions cel·lulars, d'acord amb la localització *in vivo*. Ens va indicar que la seva localització depenia de l'estat de quiescència i del contacte entre cèl·lules. També es va observar que els astròcits en quiescència tenien una mida superior als astròcits en creixement.

Es va estudiar, també, quin efecte tenia la diferenciació dels astròcits cap un fenotip de glia reactiva en l'expressió i localització de la proteïna MLC1. El cultiu d'astròcits va ser tractat amb dB-AMPC durant 1, 2 i 3 setmanes. La morfologia de les cèl·lules canviava cap a una forma estrellada amb processos llarg i prims, com es pot veure en la figura 39 (A). De la mateixa manera que en els cultius d'astròcits anteriors, es podia observar que la localització de MLC1, a 1 setmana, era difusa en el citoplasma, mentre que a les 2 setmanes, ja es començava a detectar a unions entre astròcits, i a les 3 setmanes es localitzava clarament en els processos astrocitaris. Els nivells de proteïna augmentaven a partir de les 2 setmanes, com mostra el WB d'aquest cultiu (B).

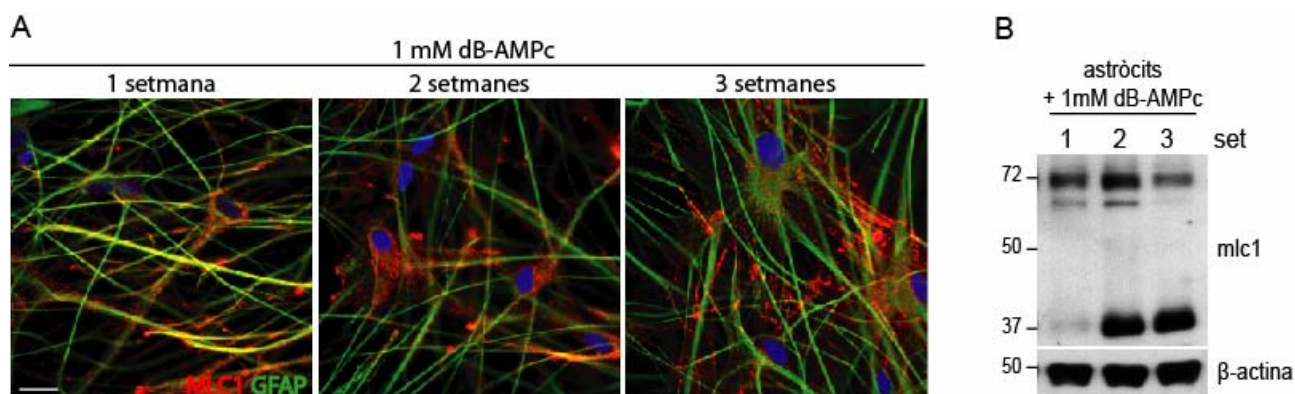


Figura 39. Localització cel·lular i expressió de MLC1 en cultius d'astròcits tractats amb dB-AMPc (1mM) a 1, 2 i 3 setmanes. (A) Immunocitoquímica on es mostra MLC1 (vermell), GFAP (verd) i nuclis (blau). Barra, 20 μ M. (B) WB on es mostra el nivell d'expressió de MLC1 a 1, 2 i 3 setmanes. L'actina s'usa com a control de càrrega.

Els resultats anteriors ens van permetre establir les condicions de cultiu d'astròcits i del cultiu mixt amb neurones, per tal de detectar una bona expressió de MLC1, i una localització de la proteïna en les unions entre astròcits.

2.2. Localització de MLC1 a unions astrocitàries

Per clarificar la naturalesa de les unions observades entre els astròcits que contenien MLC1, es van fer dobles immunofluorescències amb tota una bateria d'anticossos contra proteïnes que es localitzaven en diferents tipus d'unions, ja siguin adherents, tipus *tight*, *gap*, focals, hemidesmosomes o filopòdia (figura 40). Com es mostra a les imatges, MLC1 tenia un cert grau de colocalització (*merge*) amb ZO-1 (A) i ocludina (B) (unions *tight*) i amb β -catenina (C) i N-caderina (D) (unions adherents), aquesta última més intensament en cultius confluents. La connexina-43 (Cx43), típica d'unions *gap*, colocalitzava parcialment amb MLC1 (E), ja que MLC1 estava distribuïda uniformement en els processos entre astròcits, i la Cx43 estava localitzat en punts discrets al llarg d'aquests processos. La vinculina (F) (adhesions focals) i l'ezrina (G) (filopòdia) no presentaven la mateixa localització que MLC1. Tampoc colocalitzava amb la plectina (hemidesmosomes) (H) ni amb la paxillina (adhesions focals) (I).

Aquestes dades correlacionaven amb els resultats obtinguts per microscopia electrònica, tant en el cervell de ratolí com en el cervell humà, on les dobles *immunogolds* en teixit, realitzades pel Dr. Albert Martínez (UB), van mostrar que existia colocalització entre MLC1, ZO-1 i ocludina (annex 1).

Els resultats ens indicaven que MLC1 estava localitzat en unions, que s'havien definit com a unions complexes, ja que estaven formades tant per proteïnes típiques d'unions *tight*, adherents i *gap*, però no permetien concloure que la funció de MLC1 fos la de ser una proteïna d'adhesió.

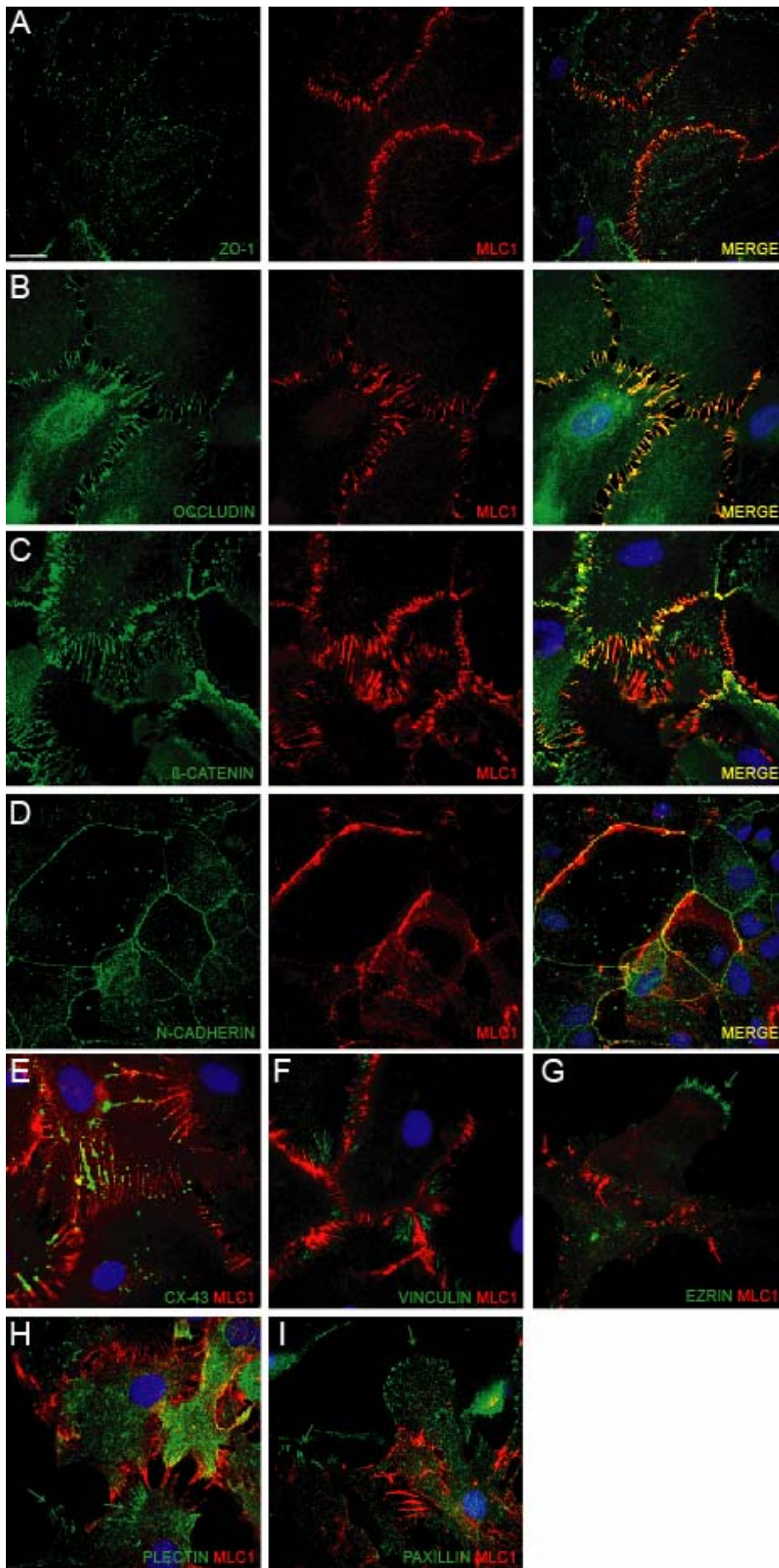
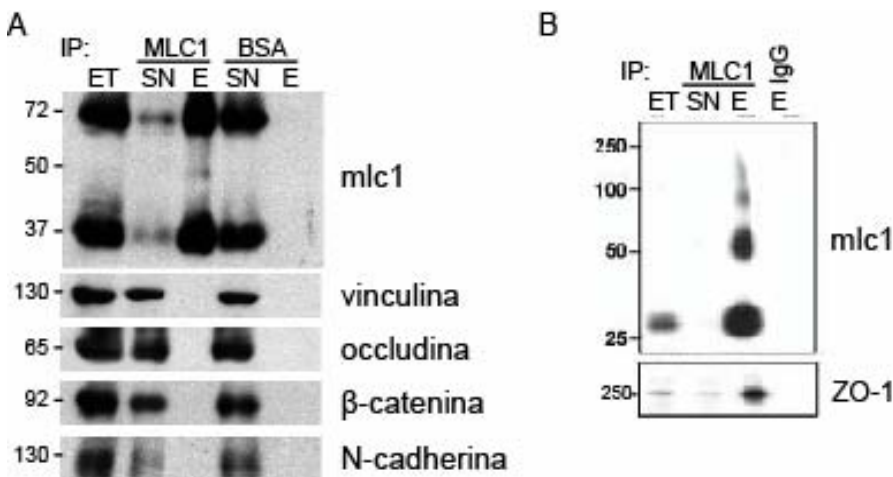


Figura 40. Dobles immunocitoquímiques en el cultiu primari d'astròcits de rata entre MLC1 (en vermell) i les diferents proteïnes d'unions (en verd): unions *tight*, ZO-1 (A) i occludina (B); unions adherents, β -catenina (C) i N-cadherina (F), on s'observa un elevat grau de colocalització (*merge*). Amb Cx-43 (E), unions *gap*, s'observa una colocalització parcial, mentre que amb vinculina (F, adhesió focal), ezrin (G, filopòdia), plectin (H, hemidesmosomes) i paxillina (I, adhesió focal) no s'observa colocalització. Barra, 20 μ m.

Per comprovar si existia interacció entre MLC1 i les diferents proteïnes, es van fer experiments de co-immunoprecipitacions a partir d'extracte d'astròcits de rata. Es va immunoprecipitar MLC1 amb l'anticòs contra la proteïna MLC1 de ratolí, i les diverses proteïnes d'unions es van detectar per WB (figura 41). Es pot observar que l'anticòs unit a la reïna va immunoprecipitar pràcticament tota la proteïna MLC1 (E en A i B) i que aquesta unió era específica, com mostra el control negatiu de BSA o IgGs. Les diferents proteïnes d'unions vinculina, occludina, β -catenina i N-caderina, no co-immunoprecipitaven juntament amb MLC1 (A). En canvi, l'anticòs contra ZO-1 va detectar una banda corresponent a la proteïna que s'immunoprecipitava juntament amb MLC1 (B).



reïna (sobrenedant, SN) i la proteïna unida (eluit, E). Com a control d'interacció inespecífica s'ha utilitzat una reïna acoblada a BSA o a IgGs. Es pot observar que MLC1 immunoprecipita pràcticament tot (E MLC1) i que la unió és específica ja que no s'uneix a BSA, mentre que no existeix co-immunoprecipitació amb vinculina, occludina, β -catenina ni N-caderina. (B) WB de la co-immunoprecipitació detectada amb ZO-1, on es pot observar la banda corresponent a la proteïna en la fracció eluïda, juntament amb MLC1.

Figura 41. Co-immunoprecipitacions astròcits de rata on s'immunoprecipita amb MLC1 i es detecten diverses proteïnes d'unions per WB. (A) El WB mostra l'extracte total (ET) que s'immunoprecipita, la fracció de proteïna no unida a la

Un estudi de les proteïnes que interaccionen amb MLC1, realitzat per l'empresa Logopharm (Alemanya), va donar com a resultat entre d'altres, GlialCAM, la qual co-immunoprecipitava en membranes de cervell de rata juntament amb MLC1. GlialCAM és una proteïna codificada per *HepaCAM* en el SN, una proteïna de la família de les IgGs involucrada en adhesió en astròcits (Favre-Kontula et al., 2008). Posteriorment i en col·laboració amb ells, el grup de la Dra. Marjo Van der Knaap (Holanda) va seqüenciar el gen d'*HepaCAM* del 20% dels pacients amb MLC que no presentaven mutacions en *MLC1*. Els resultats van ser que el gen *HepaCAM* presentava diverses mutacions, tant en homozigosi com en heterozigosi, en el 17% (del total) dels pacients.

A partir d'aquestes dades, el nostre grup va caracteritzar la localització de la proteïna GlialCAM en el model astrocitari. Per això, es va fer la immunocitoquímica en astròcits en cultiu amb un anticòs comercial contra la proteïna humana de GlialCAM (R&D Systems). Com es pot observar a les imatges (figura 42), vam detectar la proteïna a astròcits, concretament en els processos astrocitaris entre cèl·lules (A), i difusa en el citoplasma i en auto-processos en astròcits aïllats (B), com passava amb MLC1. La doble IF amb MLC1 (C), mostra que existia colocalització entre les dues proteïnes (en groc). També es va comprovar si podíem reproduir la interacció entre GlialCAM

i MLC1. La co-immunoprecipitació es va fer mitjançant la reïna acoblada covalentment a MLC1 (D), on ens mostra que podíem detectar GlialCAM (fletxa) immunoprecipitant juntament amb MLC1.

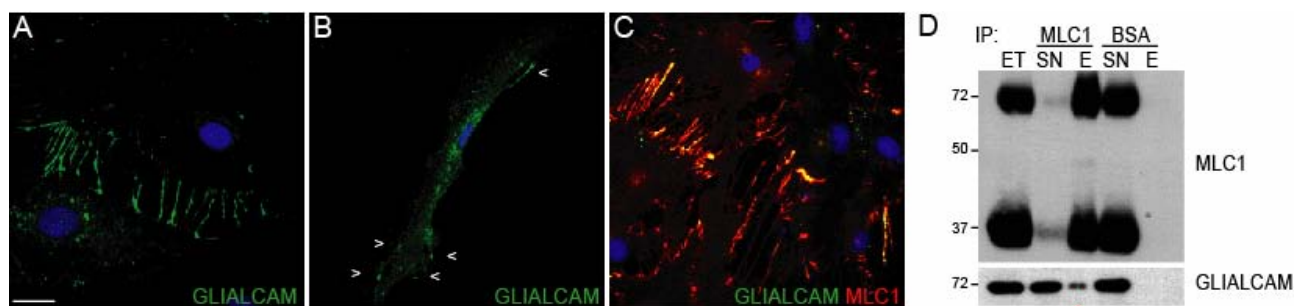


Figura 42. Expressió de GlialCAM en el model astrocítari i interacció amb MLC1. (A) Immunofluorescència amb l'anticòs contra GlialCAM (R&D Systems) en astròcits en cultiu on es localitza la proteïna en processos astrocítaris i (B) en auto-processos en astròcits aïllats. (C) Doble IF amb anti-GlialCAM i anti-MLC1 en el model d'astròcits, on es pot observar una perfecta colocalització. Barra, 20 µm. (D) Co-immunoprecipitació de MLC1 i detecció per WB amb els anticossos contra MLC1 i GlialCAM, on es pot veure GlialCAM co-immunoprecipita juntament amb MLC1 (fletxa).

2.3. Colocalització de MLC1 amb proteïnes del complex distrofina-glicoproteïna (DGC)

Alguns autors han afirmat que MLC1 estava associat al DGC (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007; Lanciotti et al., 2010). Com que la localització de MLC1 descrita pel nostre grup era en els contactes entre astròcits, i no en les unions entre astròcit-endoteli, on es trobava el DGC, es van fer dobles immunofluorescències en el model astrocítari quiescent i en creixement, amb diverses proteïnes del DGC: la sintrofina (SIN), les subunitats α - i β -distroglicà (α -DG i β -DG), la β -distrobrevina (β -DB) i l'aquaporina-4, proteïna que el seu anclatge a la membrana perivascular astrocítaria depenia del DGC.

Les imatges de IF d'astròcits en creixement (figura 43 A, només es mostra α -DG), mostrava un senyal de MLC1 difús pel citoplasma, mentre que α -DG es localitzava en patrons allargats a la membrana. En canvi, en el cultiu d'astròcits quiescents on MLC1 tenia una clara localització a les unions entre astròcits, α -DG apareixia difusa en el citoplasma. Els mateixos resultats es van obtenir per les altres proteïnes del DGC. La microscopia electrònica per doble *immunogold*, realitzada per la Dra. Marjo Van der Knaap (Holanda) en el cervell humà (B), va mostrar que no existia colocalització entre la proteïna MLC1 (partícules grans), localitzada en unions astrocítaries i β -DG (partícules petites), localitzada en la membrana dels astròcits en contacte amb la làmina basal. Es va comprovar si existia interacció entre MLC1 i les proteïnes del DGC per immunoprecipitació (C), a partir de teixit d'escorça cerebral de rata. Les proteïnes es van detectar per WB, on s'observava que MLC1 s'havia immunoprecipitat, mentre que les proteïnes del DGC no co-immunoprecipitaven juntament amb MLC1.

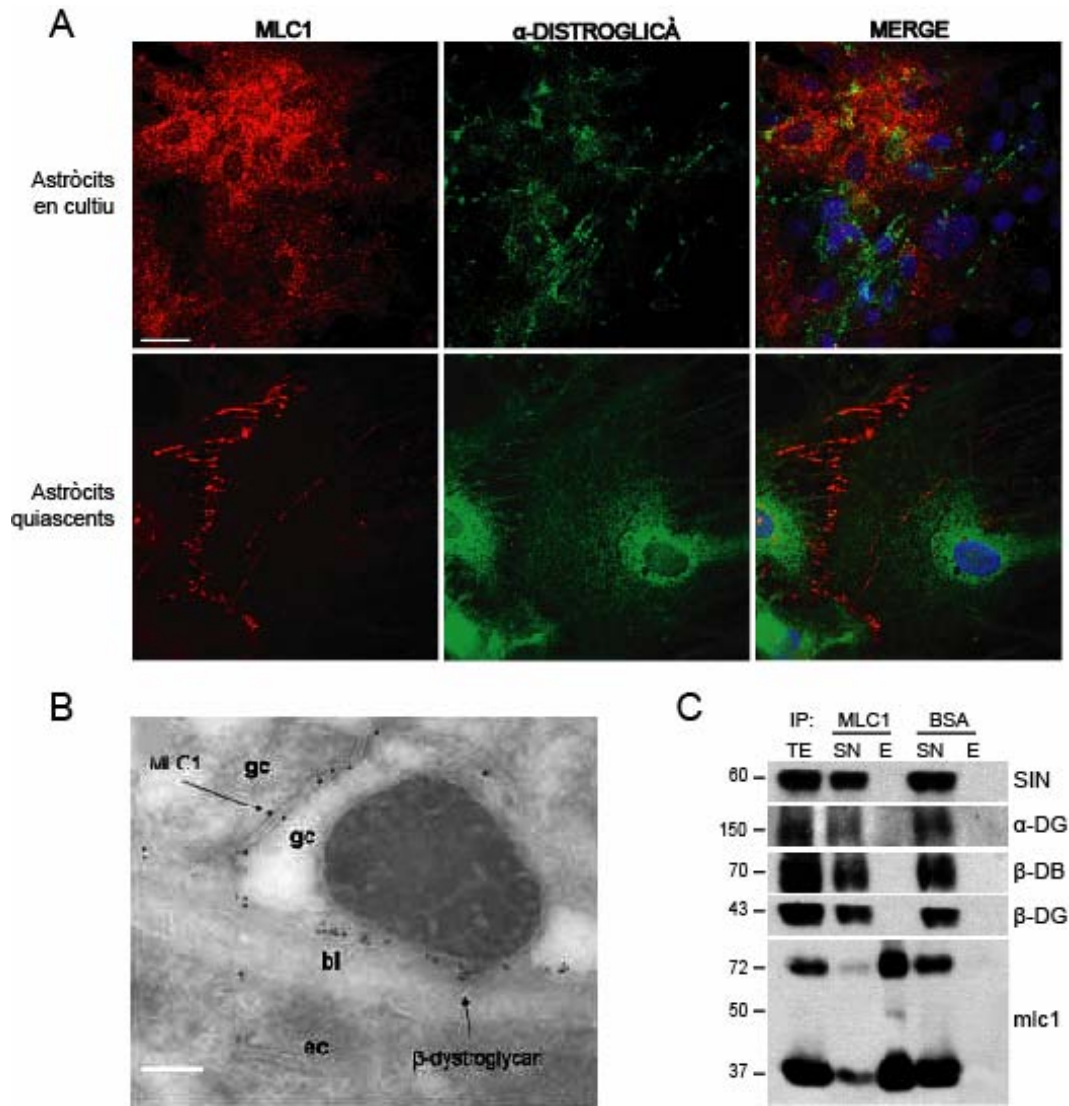


Figura 43. Colocalització de MLC1 amb proteïnes del complex distrofina-glicoproteïna (DGC). (A) Doble IF que mostra un cultiu d'astròcits en creixement (a dalt), on MLC1 (vermell) es troba difús en el citoplasma mentre que α -distroglicà (verd) presenta uns patrons allargats a membrana, i no s'observa colocalització (merge). I un cultiu quiescent (a baix), on MLC1 té una localització a unions entre astròcits i en canvi, α -distroglicà presenta un senyal citoplasmàtic difús i perinuclear. Barra, 20 μ m. (B) Doble *immunogold* per microscopia electrònica entre MLC1 i β -DG en cervell humà. Barra, 200 nm. (C) Co-immunoprecipitació amb MLC1 i com a control, BSA. El WB mostra la immunoprecipitació específica de MLC1 (E, MLC1) en teixit d'escorça de rata, però no hi ha co-immunoprecipitació de les proteïnes de DGC, ja que no apareixen les bandes a la fracció eluïda.

Estudis de immunohistoquímica de teixit procedent de ratolins *knock-out* (KO) d'algunes proteïnes del DGC, com els ratolins KO d'utrophin, KO de distrofina ($mdx^{\beta-geo}$) i KO de α -distrobrevin (Haenggi and Fritschy, 2006; Moukhles and Carbonetto, 2001; Rees et al., 2007), realitzades pel grup col·laborador del Dr. Dareck Górecki (Regne Unit), van mostrar que no hi havia canvis ni en l'expressió, ni en la localització de MLC1 quan es comparava amb el wt (annex 2).

Tots els resultats apuntaven a que MLC1 no formava part del complex distrofina-glicoproteïna, com ja s'havia descrit anteriorment (Teijido et al., 2004).

2.4. Relació de MLC1 amb el citoesquelet

Vam voler estudiar en els astròcits, quin tipus de citoesquelet formava part de les unions, i com afectava la disrupció d'aquest a la integritat de les unions i a la localització de MLC1. Per alterar el citoesquelet, es van seguir dues estratègies: per una banda, la utilització de compostos que estabilitzaven o desestabilitzen els microfilaments d'actina i els microtubuls, i per altra banda, l'expressió d'un mutant de GFAP que causa agregació dels filaments intermedis, provocant la malaltia d'Alexander.

Els astròcits, en quiescència durant 3 setmanes, van ser tractats amb els compostos colchicina, com a desestabilitzador de microtubuls, o amb el taxol (Paclitaxel), com a estabilitzador. També es van tractar amb la cytochalasina-D (cyt-D), que desestructurava els microfilaments d'actina (Nicchia et al., 2008; Sorci et al., 1998). Per agregar els filaments intermedis, es va construir la GFAP humana wt i el mutant R239C (Hsiao et al., 2005), ambdues fusionades a la proteïna GFP, les quals es van transfectar al model astrocitari..

Es van realitzar les IF (figura 44), que mostraven que MLC1 estava localitzada en les unions, colocalitzant amb actina i GFAP (A i C, amplificacions a l'esquerra), mentre que no s'observava colocalització amb β -tubulina (B). El tractament amb cyt-D a 5 μ M, desestructurava parcialment l'actina (D), on encara es podia veure que MLC1 mantenia parcialment la seva localització, però quan l'actina es desestructurava completament amb cyt-D a 10 μ M (E), desapareixia la forma cel·lular i les unions, i MLC1 quedava difusa pel citoplasma. Per contra, el tractament amb colchicine, desestructurava totalment la tubulina (F), però la forma de la cèl·lula i les unions no es modificaven, mantenint la localització de MLC1 als processos. Un resultat similar l'observàvem amb l'estabilitzador de la tubulina, taxol (G). Per últim, quan transfectàvem amb la GFAP wt, aquesta formava la xarxa de filaments intermedis que s'integrava amb la xarxa endògena. En canvi, quan expressàvem el mutant R239C de la GFAP, aquest s'agregava actuant com a mutant dominant sobre la xarxa endògena de filament intermedis, fent que s'agregessin (colocalització entre la GFAP endògena i la GFAP-GFP wt i el mutant no mostrat). En els dos casos, MLC1 sembla no modificar la seva localització (H i I).

També vam mirar, per WB, si els nivells de la proteïna MLC1 estaven alterats pel tractament amb els diferents compostos taxol, cochicine i cytochalasin-D, sense observar canvis en l'expressió de la proteïna.

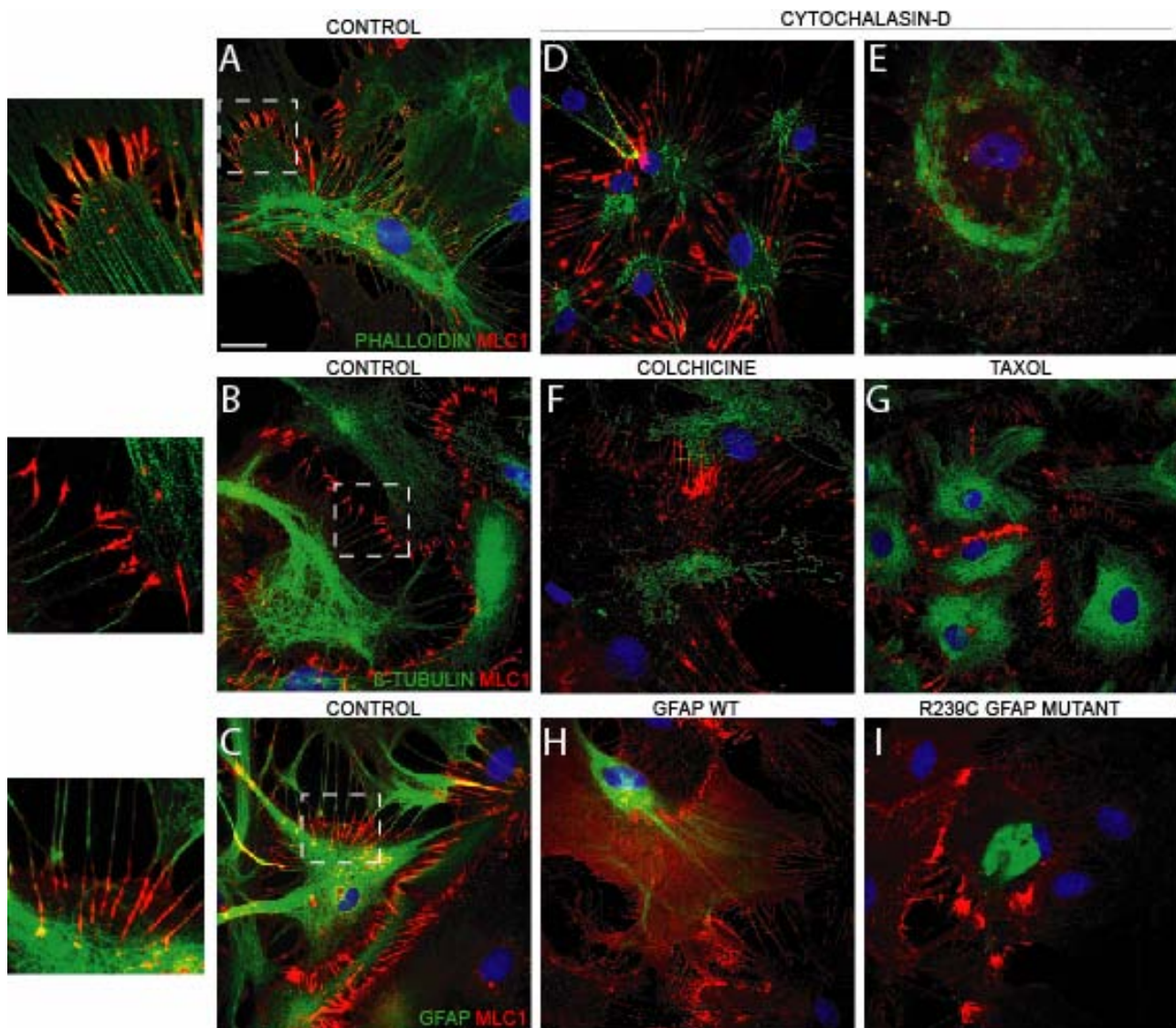


Figura 44. Colocalitzacions entre MLC1 i les proteïnes del citoesquelet en astròcits primaris de rata. (A-C) Dobles immunofluorescències en astròcits control amb MLC1 (vermell) i actina (phalloïdina, A), β -tubulina (B) i GFAP (C) (en verd), on es pot observar colocalització entre MLC1, phalloïdina i GFAP, mentre que no s'observa amb la β -tubulina (amplificacions a l'esquerra). (D, E) Tractament dels astròcits amb la cytochalasin-D a 5 i 10 μ M respectivament durant 2h. Es mostra una desestructuració parcial de l'actina a 5 μ M (D) on MLC1 encara manté parcialment la seva localització a unions, mentre que la disrupció total de l'actina a 10 μ M (E) mostra la pèrdua d'unions entre astròcits i la subseqüent deslocalització de MLC1. (F, G) Tractament dels astròcits amb la colchicine (10 μ g/ml) durant 20h (F) i el taxol (10 μ M) durant 24h, (G) on es pot observar que MLC1 no varia la seva localització a unions. (H, I) Astròcits transfectats amb la GFP-GFAP wt (H) i el mutant R239C (I) on es pot observar que la GFAP wt s'integra a la xarxa de filaments intermedis endògens mentre que el mutant s'agrega, sense produir una alteració en la localització de MLC1. Barra, 20 μ m.

En el cas dels filaments intermedis, encara que no vam observar una deslocalització de MLC1 en els astròcits, també vam voler estudiar la localització *in vivo* de MLC1. Els estudis es van fer en una mostra de cervell d'un pacient d'Alexander, amb la mutació c.1246C>T / p.R416W *de novo* a GFAP, en col·laboració amb la Dra. M. Van de Knaap (Holanda), i en un model de ratolí d'Alexander, on la GFAP portava la mutació R236H en heterozigosi (Hagemann et al., 2006), en col·laboració amb el Dr. Albee Messing (USA). La immunohistoquímica (figura 45) mostra el senyal en el cervell de ratolí wt (A) i en el cervell del ratolí mutant (B), on no s'observava un patró alterat en la localització de MLC1, com tampoc s'observava una deslocalització en MLC1 en un cervell d'un pacient d'Alexander (C), on es trobava localitzat en astròcits perivasculars. A nivell

tissular no semblava que hi hagués cap alteració en MLC1, però amb aquesta tècnica no es podia dir si a nivell subcel·lular existia un canvi en la seva localització.

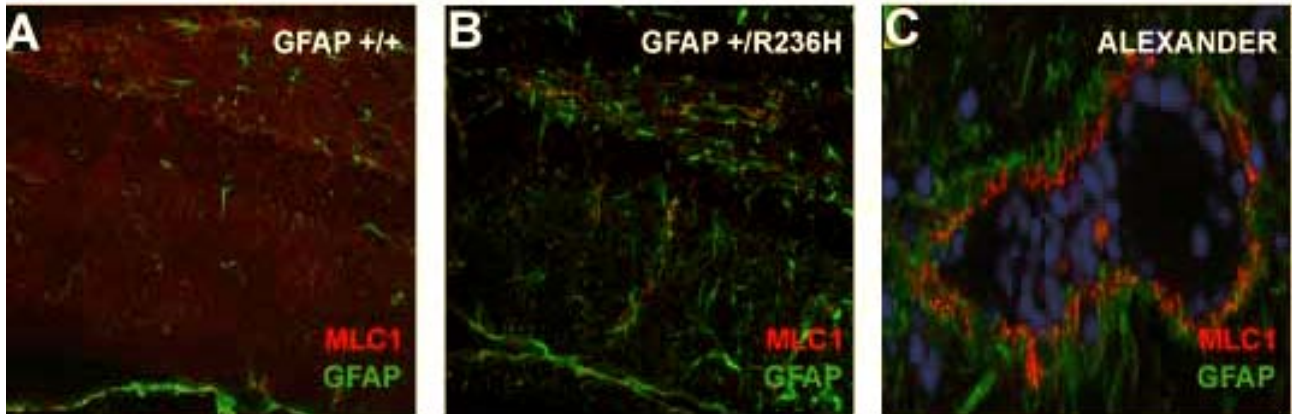


Figura 45. Expressió de MLC1 en teixits cerebrals d'Alexander. Doble immunohistoquímica amb MLC1 (vermell) i GFAP (verd) d'un cervell de ratolí control (A), d'un cervell d'un ratolí amb la mutació de GFAP R236H (B) i d'un cervell humà d'un pacient d'Alexander (C). No s'observa un canvi de localització de MLC1.

En aquest punt, no teníem coneixement de la funció ni de la naturalesa dels processos astrocitaris observats en el model, on estava localitzada la proteïna MLC1. L'estudi detallat d'aquests processos ens va mostrar que podien ser molt curts o molt llargs (1-100 µm), alguns es ramificaven i, fins i tot, podien arribar a atravesar un astròcit (figura 46, A). A part de l'actina, estaven formats per GFAP en tota la seva longitud, sobretot aquells que estaven sobreposats a l'astròcit veí (B). Quan ens vam fixar en la distribució de MLC1 al llarg del procés (B', magnificació de B), vam poder observar que no era uniforme, ja que apareixen zones on MLC1 no hi era present (fletxes). Les dobles immunocitoquímiques amb Cx43 (C i C') van rebel·lar que en aquestes zones, on no hi havia marcatge de MLC1 (fletxes en C), s'hi detectava Cx43 (fletxes en C').

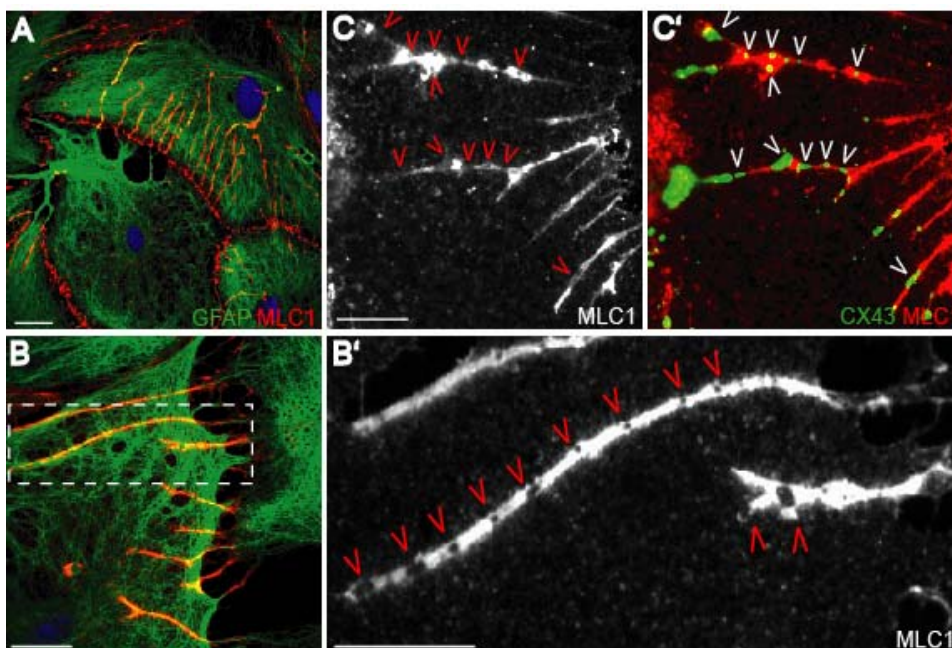


Figura 46. Distribució de MLC1 en els processos astrocitaris. (A) MLC1 es localitza en processos astrocitaris formats per filaments intermedis (GFAP) els quals poden tenir una llargada variable (1-100 µm) i estar ramificats. (B) Detall de dos processos d'un astròcit superposats a l'astròcit veí. La distribució de MLC1 no és continua ja que apareixen zones on MLC1 no hi es present (fletxes, B'). (C-C') En les zones on MLC1 no es detecta (fletxes en C), apareix marcatge de la Cx43, proteïna que forma les unions gap (fletxes en C'). Barra, 20 µm.

2.5. Model cel·lular d'astròcits humans fetals

Per estudiar la proteïna en un model cel·lular humà, es va intentar treballar amb un cultiu d'astròcits humans fetals, mostres procedents d'un fetus control de 14,5 setmanes. La dificultat d'aquest cultiu va ser que els astròcits es trobaven en una fase immadura en aquest estadi del desenvolupament, al contrari de les neurones. Per això, les mostres d'hipocamp es van deixar durant 1 mes en cultiu, fent passatges quan arribaven a confluència, i després es van sembrar i tractar amb Ara-C durant 3 setmanes. Com es pot veure en la figura 47, la morfologia dels astròcits d'hipocamp (A) era poligonal aplanada, semblant als astròcits de rata. El senyal corresponent a la proteïna MLC1 es detectava al final dels processos astrocitaris, però amb molt senyal citoplasmàtic. La tinció amb la GFAP ens indicava que eren astròcits, i es podia observar cert grau de colocalització amb l'actina. També es va analitzar si els astròcits humans tenien les unions complexes descrites anteriorment, per això es van provar els marcadors d'unions β -catenina, occludina i ZO-1, els quals van mostrar un marcatge a unions entre astròcits. Els astròcits d'escorça van donar resultats similar (no mostrat).

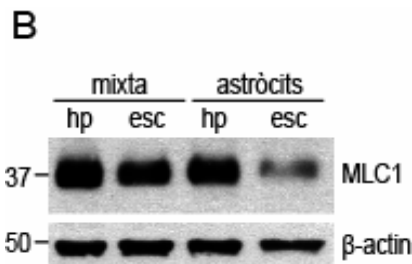
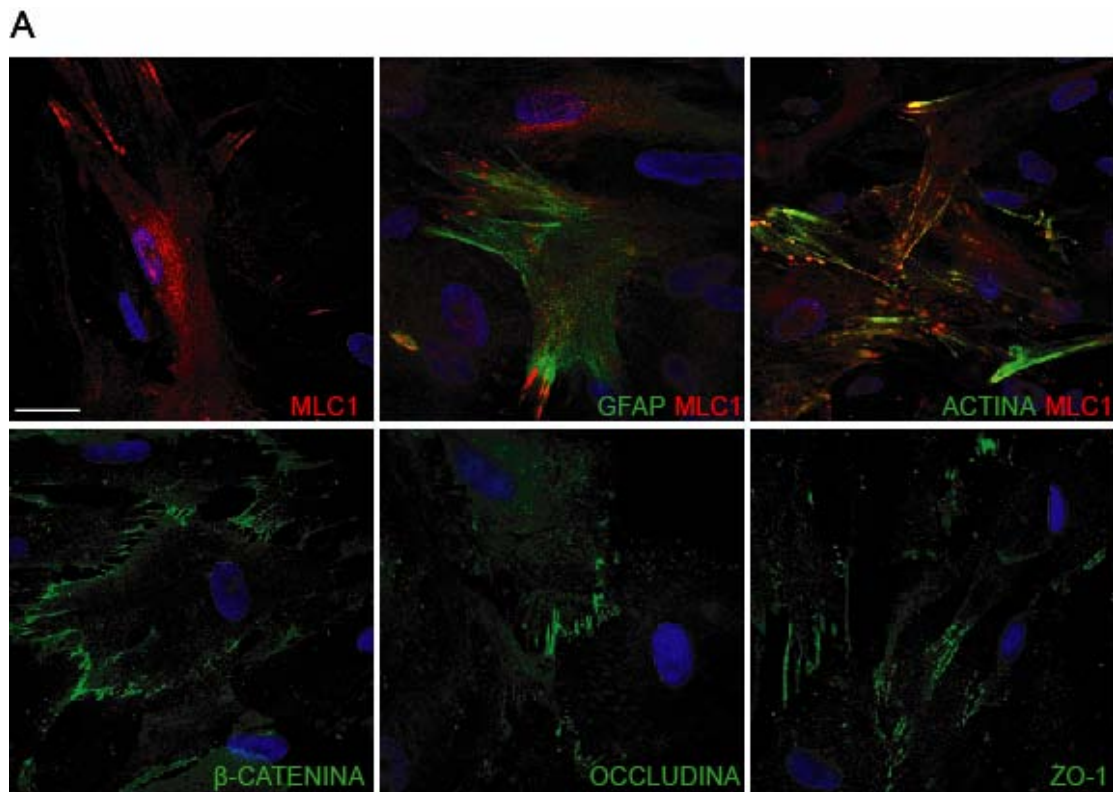


Figura 47. Localització i expressió de MLC1 en cultius primaris d'astròcits humans fetals. (A) Immunocitoquímica en astròcits de hipocamp de MLC1 (vermell, anticòs MLC1 N4) i doble IF amb proteïnes del citoesquelet GFAP i actina (verd) on es pot observar una localització de MLC1 a processos i citoplasma, colocalitzant amb actina. Caracterització de les unions β -catenina (unions adherents) i occludina i ZO-1 (unions *tight*) en verd. Barra, 20 μ M. (B) WB on es comparen els nivells d'expressió de MLC1 en un cultiu d'astròcits d'hipocamp i d'escorça, on es pot veure més expressió a hipocamp, i en el cultiu mixt amb neurones. L'actina s'utilitza com a control de càrrega.

Aprofitant que en aquest estadi de desenvolupament fetal els precursors neuronals eren més madurs, es van fer els cultius mixtos d'astròcits i neurones d'hipocamp i d'escorça, en les mateixes condicions anteriors. Es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna MLC1, comparant el cultiu d'astròcits sols i el mixt (figura 47, B). S'observava la mateixa tendència que havíem observat en els astròcits de rata, els nivells de proteïna d'hipocamp eren més elevats que els d'escorça, i la presència de neurones incrementava el senyal, degut a que també expressaven MLC1.

2.6. Característiques funcionals del model astrocitari

En aquest capítol hem pogut observar que, el model d'astròcits amb el que es treballa, presentava una morfologia cel·lular aplanada poligonal i una mida superior, comparada amb els astròcits en creixement. També s'ha descrit que les unions entre astròcits estaven formades per varies proteïnes de diferents tipus d'unions, com les unions adherents, *tight* i *gap*. En aquest apartat, s'ha volgut estudiar, en el nostre model astrocitari, dues propietats cel·lulars relacionades amb els diferents tipus d'unions, com són la difusió intracel·lular i la permeabilitat paracel·lular.

2.6.1. Difusió intracel·lular

Els astròcits presenten unions *gap* la funció de les qual és la comunicació entre astròcits, el pas d'aigua i ions, com el Ca^{2+} , neurotransmissors, etc. Ja que MLC1 colocalitza parcialment amb la connexina-43 en el nostre model d'astròcits, vam voler veure si la difusió intracel·lular, en els astròcits quiescents, era diferent a la que presentaven els astròcits en proliferació. Per aquest estudi, es va fer servir la tècnica de *scrape-loading* amb dues molècules de diferents mides, la Lucifer yellow (457 Da), que difon a través de les unions *gap*, i un dextrà conjugat amb rodamina (10 kDa) que no difon, com a control negatiu. També es va utilitzar un inhibidor de la comunicació cel·lular via unions *gap*, l'octanol.

Es van fer dos tipus de cultiu per comparar-los, un cultiu d'astròcits en creixement, que es van deixar fins a la confluència, i un cultiu d'astròcits en quiescència durant 3 setmanes, també a confluència. Les imatges de fluorescència (figura 48) revelaven que els astròcits en creixement, a part de tenir una mida cel·lular més petita (àrea mitjana 2196 ± 173), presentaven una difusió de 0,102 distància/àrea corresponent a $5,2 \pm 0,17$ cèl·lules, que era bloquejada per l'octanol (0,03 dist./àrea), amb resultats similars pel dextrà (0,037 dist./àrea). En canvi, els astròcits quiescents tenien una mida superior (àrea mitjana $4208,1 \pm 490$) i presentaven una difusió de 2,2 vegades menor que els astròcits en proliferació, de 0,047 dist./àrea corresponent a $1,8 \pm 0,14$ cèl·lules. Si es comparava amb els controls, es podia observar que donava un resultat similar (0,043 dist./àrea en presència d'octanol, 0,038 dist./àrea en presència del dextrà).

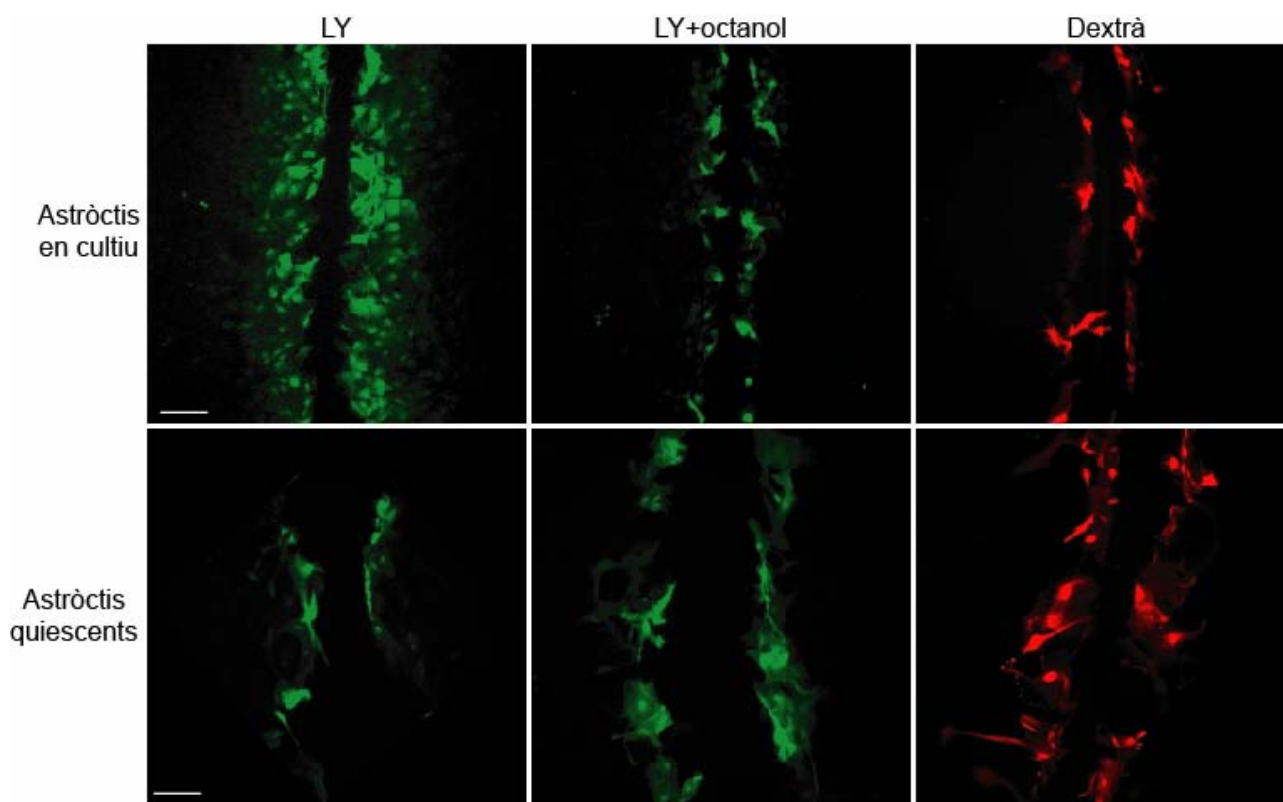


Figura 48. Imatges de fluorescència de dos cultius d'astròctis, un en creixement i l'altre en quiescència on s'hi ha realitzat la tècnica de *scrape-loading* per estudiar la difusió intracel·lular a través de les unions *gap*. La difusió s'observa amb el Lucifer Yellow (LY, 457 Da, en verd) i és bloquejada amb l'octanol. El control de no difusió es fa amb el dextrà conjugat amb rodamina (10 kDa, en vermell). Barra, 500 μ m.

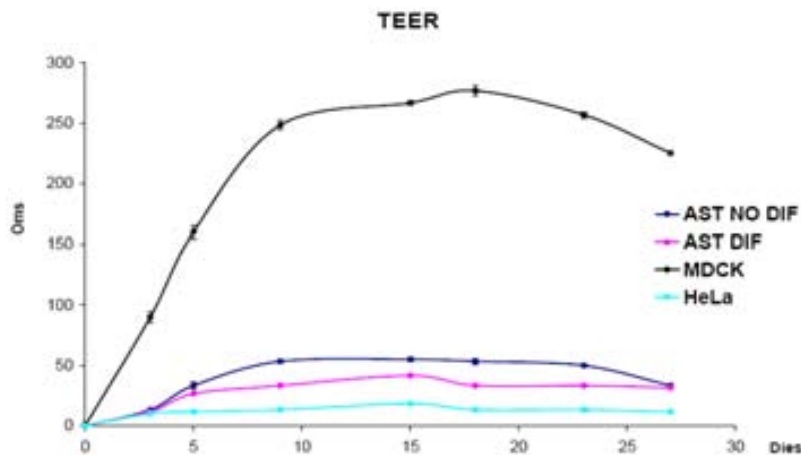
Aquest resultat suggeria que els astròctis, en estat de quiescència, variaven les propietats de comunicació intracel·lular sent aquesta més restringida. Tot i així, s'ha de tenir en compte que aquesta tècnica és qualitativa i que són resultats preliminars, seria necessari fer més experiments, com l'estudi de la comunicació via unions *gap* i la difusió del Ca^{2+} en aquest model.

2.6.2. Difusió paracel·lular

MLC1 colocalitzava i interaccionava amb ZO-1 en astròctis, però no es coneixia quin paper jugaven aquest tipus d'unions en aquest tipus cel·lular. Les unions tipus *tight*, a l'endoteli, formen la barrera hematoencefàlica i estan involucrades en la regulació de la permeabilitat paracel·lular de l'aigua i de determinats ions. Ens vam preguntar si les unions complexes, observades en el model astrocitari, contribuïen *per se* a la formació d'una barrera, juntament amb l'endoteli.

Aquest estudi es va realitzar creixent les cèl·lules *transwells*, fet que permetia la polarització de les cèl·lules. Com a model, es van fer servir les cèl·lules MDCK, ja que són capaces de presentar una resistència elèctrica iònica entre la part apical i la basal (TER). Aquesta base es va utilitzar per estudiar les propietats de barrera dels astròctis. Es van realitzar 4 cultius diferents en *transwells*: (i) un cultiu de cèl·lules MDCK, com a control positiu; (ii) un cultiu de cèl·lules HeLa, com a control negatiu, ja que no tenen aquests tipus d'unions; i (iii) un cultiu d'astròctis en creixement i (iv) un cultiu d'astròctis en quiescència, per tal de comprovar les diferències entre ells. La mesura de la TER es va realitzar durant 28 dies. Com s'observa a la gràfica 5, les cèl·lules MDCK presenten

uns valors de resistència que arriben fins als 300 Ω , mentre que les cèl·lules HeLa tenen valors de 10 Ω . El cultiu d'astròcits en creixement, va donar uns valors màxims de 60 Ω , mentre que els astròcits quiescents mostraven valors de 40 Ω .



Gràfica 5. Representació de la mesura de la resistència elèctrica transepitelial (TEER) dels diferents cultius, durant 28 dies: MDCK, com a control positiu, HeLa, com a control negatiu, i astròcits en creixement (ast no dif) i aturats en cicle (ast dif).

3. Model neuronal de MLC1

Al llarg del present treball s'ha esmentat l'expressió de MLC1 en neurones detectada en teixit, tant en ratolins com en humans. Per això, es va voler caracteritzar l'expressió i localització de MLC1 a neurones en cultiu.

3.1. Model neuronal de rata

Tal com es va fer amb el model astrocitari, el primer pas va ser determinar en quines condicions es detectava la proteïna a neurones. Per això, es van fer els estudis en els cultius neuronals i mixtos, en presència d'uridina/fluoridina durant 1, 2 i 3 setmanes per aturar la proliferació glial. Es va observar per WB (figura 49, A) que els nivells de proteïna MLC1 començaven a aparèixer a 1 setmana en cultiu, a les 2 setmanes augmentava, disminuint a les 3 setmanes.

Un cop detectada la proteïna, es van realitzar dobles IF amb MLC1 i diferents proteïnes típicament de neurones, com la tubulina neuronal (tuj1), l'actina, i proteïnes que formen el complex SNARE, implicat en l'exocitosi de vesícules de transport sinàptiques (sinaptofisina, MAP2, SNAP25 i syntaxina) (Dehmelt and Halpain, 2005; Ungar and Hughson, 2003). En la figura 49 (B) corresponent a un cultiu neuronal de 2 setmanes, es mostra la localització de MLC1 (vermell) i la tubulina (tuj 1), l'actina (phalloïdina), la sinaptofisina, MAP2, SNAP25 i la syntaxina, on es pot observar que MLC1 té un marcatge majoritàriament axonal, colocalitzant amb la tubulina. També es pot veure un cert grau de colocalització amb SNAP25, la sinaptofisina i la syntaxina, mentre que no presenta colocalització amb l'actina ni amb MAP2. En la doble IF amb MAP2 (requadre interior), es pot observar que MLC1 té un patró d'expressió en forma de línia interior, mentre que MAP2 marca la part exterior formant protuberàncies.

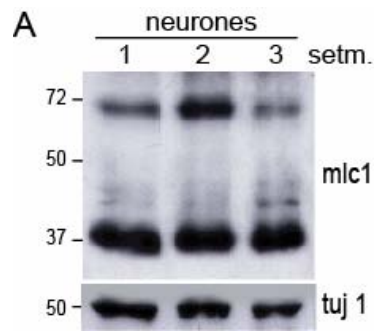
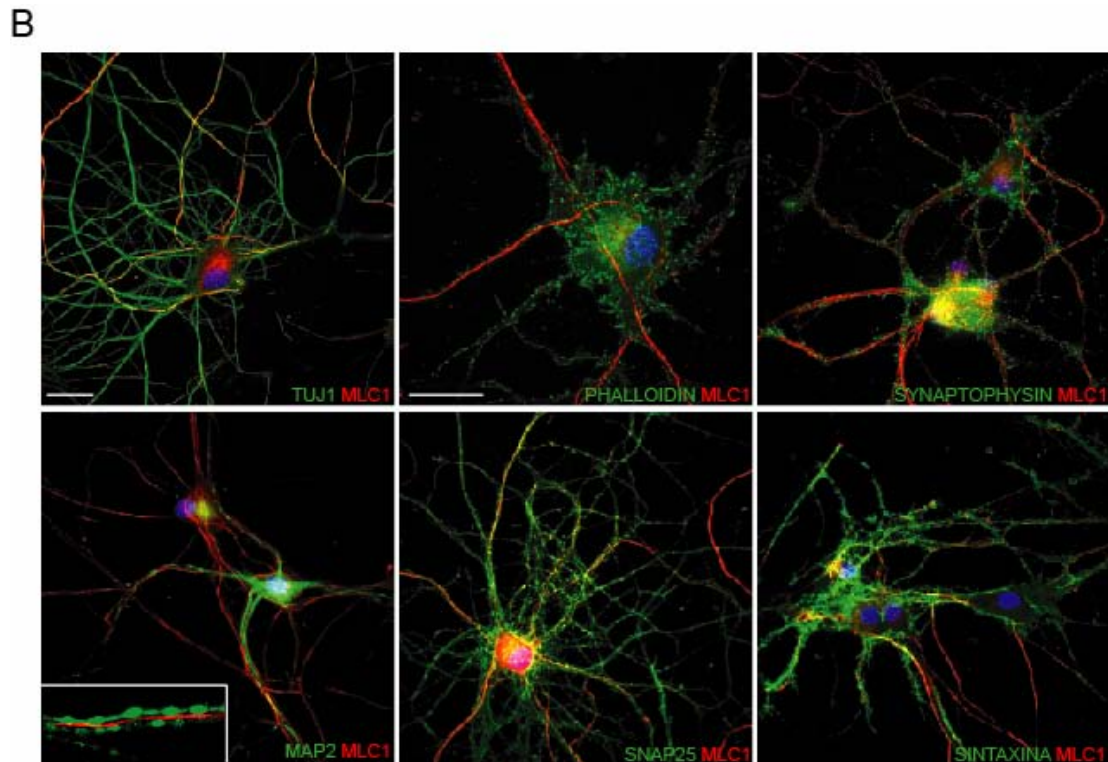


Figura 49. Caracterització de l'expressió i la localització de MLC1 en un cultiu neuronal de rata. (A) En el WB, on es mostren extractes d'un cultiu de neurones d'hipocamp de rata (E18), es detecten els nivells d'expressió de MLC1 a 1, 2 i 3 setmanes. Com a control de càrrega s'ha utilitzat la tubulina neuronal (tuj 1). (B) Dobles immunofluorescències en un cultiu neuronal d'hipocamp de rata de 2 setmanes en cultiu. MLC1 (en vermell) presenta un marcatge axonal colocalitzant amb la tubulina (tuj1) i parcialment amb SNAP25, la sinaptofisina i la sintaxina, mentre que no colocalitza amb l'actina (phalloidina) ni en MAP2 (requadre interior mostra un segment d'un axó). Barra, 20 µm.



Els resultats demostraven una expressió de la proteïna MLC1 a neurones, presentant una localització axonal amb un patró similar als filaments de tubulina.

3.2. Expressió de MLC1 en neurones fetals humanes

L'expressió i localització de MLC1 en cultiu de neurones fetals humanes va ser similar al cultiu de rata. Els resultats que es presenten corresponen a neurones fetals (14,5 setmanes de gestació) en cultiu durant 2 setmanes de dues regions cerebrals, escorça i hipocamp (figura 50). El WB (A) mostra uns nivells similars de MLC1 humà tant en neurones d'hipocamp com d'escorça, i les imatge de immunofluorescència (B), amb MLC1 (vermell) i tuj1 (verd), mostren una expressió de MLC1 bàsicament axonal i un cert grau de colocalització amb tuj1 (groc).

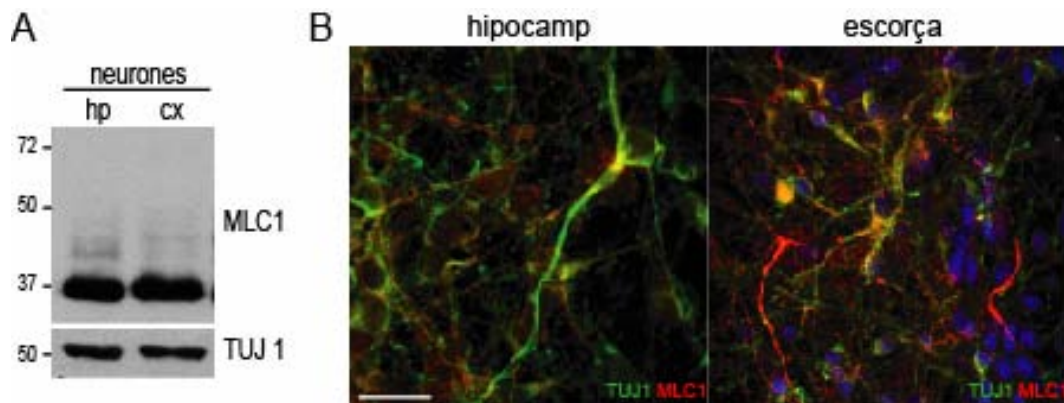


Figura 50. Estudi de l'expressió i localització de MLC1 en un cultiu de neurones humanes fetals. (A) WB on es mostren els nivells d'expressió de MLC1 en un cultiu de neurones d'hipocamp i d'escorça. Com a control de càrrega s'ha utilitzat la tubulina (tuj1). (B) Dobles immunofluorescències amb MLC1 (vermell) i tuj1 (verd) on es pot observar l'expressió de MLC1 axonal i un cert grau de colocalització amb tuj1. Barra, 20 μ m.

Les imatges de microscopia electrònica i tinció d'*immunogold* en teixit humà de cerebel i d'hipocamp, realitzades pel Dr. Albert Martínez (UB), van comprovar que la proteïna MLC1 *in vivo* en humans també es detectava en axons mielinitzats (annex 3).

4. DISCUSSIÓ

Les línies cel·lulars estudiades en aquest capítol no han mostrat l'expressió de MLC1, però això no implica que no n'hi hagin. Un estudi del patró d'expressió del gen *MLC1* (Su et al., 2004), va mostrar expressió del RNA missatger a les cèl·lules CD56⁻NK i CD34 de sang perifèrica, i amb uns nivells inferiors a les cèl·lules endotelials CD105 i als limfoblasts MOLT4. L'estudi bioquímic de la proteïna en línies derivades d'aquests tipus cel·lulars, ens podrien donar més informació sobre el paper fisiològic de MLC1 en cèl·lules no cerebrals, i potser també, noves dades sobre la fisiopatologia de la malaltia.

La caracterització del model astrocitari ens ha aportat informació sobre l'expressió i la localització de MLC1, com també la interacció d'aquesta amb altres proteïnes. La detecció de les proteïnes d'unions ZO-1, N-caderina i catenina en astròcits ja està descrita per altres autors, els quals van senyalar una localització similar a la que hem descrit nosaltres (Boda-Heggemann et al., 2009). També està descrit que, els astròcits de ratolí en cultiu expressen alts nivells del mRNA de MLC1, detectats per *microarrays* (Cahoy et al., 2008). Les unions astrocitàries, formades per les proteïnes d'unions *tight*, *gap* i adherents, ens van fer pensar que podrien actuar com a algun tipus de barrera. Els experiments realitzats, però, no han aclarit si les unions formen una barrera o si poden contribuir a la funció de barrera de l'endoteli. En aquest aspecte fan falta més estudis, com per exemple, en condicions de glia reactiva (Pekny and Nilsson, 2005). Quan es produeix una lesió cerebral acompanyada d'una ruptura de la barrera hematoencefàlica, la glia reactiva s'activa formant una cicatriu que envolta la lesió, contribueix a regular la permeabilitat de l'aigua i de determinades substàncies, i evita l'extensió de la lesió.

La distribució de MLC1 en auto-processos, observada en astròcits aïllats, és molt similar a la ja descrita anteriorment per Cx43 (no mostrat) (Wolff et al., 1998). Conjuntament amb els resultats d'aquest capítol, on es mostra que el patró d'expressió de MLC1, al llarg dels processos astrocitaris, és discontinu i Cx43 es localitza en els espais on no hi ha MLC1, suggerim que MLC1 podria estar relacionada amb les unions *gap*, participant en la seva funció de comunicació. Aquesta hipòtesi està recolzada per les dades obtingudes en els experiments de difusió intracel·lular, on hem vist que aquesta propietat varia en els astròcits quiescents, quan MLC1 està localitzat a les unions.

També està descrita la localització de GlialCAM en els processos astrocitaris (Favre-Kontula et al., 2008). La relació de GlialCAM amb la proteïna bàsica de la mielina (MBP) i la localització d'aquesta en oligodendròcits, juntament amb l'elevada expressió durant el desenvolupament del sistema nerviós, han suggerit un paper important de GlialCAM en la mielinització. El mecanisme pel qual la mielina es veu afectada en la malaltia MLC encara és incert, ja que podria estar directament relacionat amb les mutacions trobades al gen *HepaCAM*, o relacionat indirectament amb les proteïnes associades a aquesta, com MLC1.

La informació aportada sobre la diferència de localització entre MLC1 i el DGC en el model astrocitari, dona suport als estudis previs del grup, en els quals ja s'havia demostrat que MLC1 estava situat en la unió entre astròcits en teixit, i no en la membrana astrocitària adjacent a l'endoteli, on es troba el DGC (Teijido et al., 2004). Per tant, concloem que MLC1 no està associat al DGC.

Les unions astrocitàries i la localització de MLC1 en elles, depenen principalment del citoesquelet d'actina, com també s'ha descrit que passa amb altres proteïnes, com és el cas de l'aquaporina-4 (Nicchia et al., 2008). Un altre aspecte a estudiar és el transport de MLC1 fins a les unions. Està descrit que MLC1 es troba a vesícules juntament amb caveolina-1, i que el transport d'aquestes es fa a través del citoesquelet de tubulina (Lanciotti et al., 2010). Les nostres observacions (dades no mostrades), ens suggereixen que el transport de les vesícules, que contenen la proteïna MLC1, es fa a través de la xarxa de filaments intermedis.

El model neuronal ens ha revelat una localització de MLC1 distribuïda al llarg de l'axó en forma de filament, a diferència de la seva localització en el model astrocitari. Aquestes dades suggereixen que el paper funcional de MLC1 podria ser diferent en els dos tipus cel·lulars, tenint en compte la diferència de localitzacions. Encara que per desvelar aquesta incògnita fan falta més estudis de tipus funcional, malauradament en l'actualitat, la funció de MLC1 encara no està definida.

CAPÍTOL 4. ESTUDI DELS MUTANTS DE MLC1 EN EL MODEL ASTROCITARI I EN PACIENTS DE MLC

S'han descrit 63 mutacions diferents en el gen *MLC1* que causen la malaltia, que engloben delecions i insercions amb canvis de pauta de lectura, codons d'aturada, mutacions d'*splicing*, etc. El fet de no conèixer la funció de MLC1 ens porta a estudiar la proteïna a nivell bioquímic, ja que sabem que es troba a membrana plasmàtica. Estudis previs del grup de diferents mutacions en sistemes heteròlegs, com en oòcits de *xenopus* o en cèl·lules HeLa, van revelar que no totes les mutacions es comportaven igual en termes d'expressió i localització, i es van classificar en funció dels nivells de la proteïna a membrana. Les mutacions lleus, tenien uns nivells a membrana >10% en HeLa respecte el wt (N141K, S246R i L304305del), les mutacions intermitges estaven per sobre del 35% en oòcits i per sota el 10% en HeLa (G59E, P92S i A157E), i les mutacions severes tenien uns nivells <35% respecte el wt en oòcits (L83F, C85W, G88V, S93L, T118M, T118R, C125R, N141S, V210D, G212E, G212R, A245P, S280L i C326R). Estudis de glicosilació van revelar que les proteïnes que contenien mutacions severes es quedaven retingudes al reticle endoplasmàtic (RE), i eren degradades via proteasoma, mentre que els mutants lleus tenien un trànsit semblant al wt arribant a membrana, i eren reciclats via lisosomes. Per tal de recuperar els nivells d'expressió de les proteïnes mutades, es van utilitzar estratègies químiques en un cultiu de cèl·lules HeLa transfectades amb els diferents mutants: com ara disminuir la temperatura del cultiu a 33°C o afegir glicerol, que actua com a xaperona. Aquestes tècniques s'utilitzen en l'estudis de mutants de plegament (Duarri et al., 2008) (annex 4).

Tenint en compte els resultats previs, en aquest capítol s'han realitzat els estudis de localització i d'expressió de MLC1 wt i de diferents mutants en el model cel·lular d'astròcits de rata, que expressa la proteïna MLC1 endògenament i, que per tant, és un model més aproximat a les condicions *in vivo*. Per concloure l'estudi, s'han analitzat algunes de les mutacions en mostres de cervell i de sang de pacients afectats amb MLC, amb diferents mutacions en el gen *MLC1*.

Les construccions dels mutants i del wt utilitzades, es van generar a partir de MLC1 humà amb 2 epítops HA (un intracel·lular i un extracel·lular), amb el vector pCDNA3 per transfectar les cèl·lules. Per altre banda, es van construir i generar adenovirus de manera que expressessin MLC1 wt i del mutant S246R, ambdós amb 2 epítops HA.

1. ESTUDI DELS MUTANTS EN EL MODEL ASTROCITARI

1.1 Estudi de la localització dels mutants en el cultiu d'astròcits de rata

Per entendre el mecanisme fisiopatològic de les mutacions, es va realitzar l'estudi de diferents mutacions representatives de cada grup en un cultiu d'astròcits, on MLC1 s'expressa de forma endògena. Per això, es van transfectar els astròcits en creixement d'escorça de rata amb

lipofectina, i es van realitzar immunofluorescències (IF). Les cèl·lules es van transfectar conjuntament amb una proteïna de membrana, PH-GFP (domini homòleg a pleckstrina de PLC δ 1 fusionat a la GFP), per tal de poder quantificar la colocalització a membrana. Els mutants utilitzats van ser S246R (mutant lleu), G59E (mutant intermig) i A245P i S280L (mutants severes) detectats amb l'anticòs contra l'epítot HA. Com es pot observar en les imatges de IF (figura 51), MLC1 wt colocalitzava amb la PH-GFP a membrana (en groc), mentre que en el control amb PH-GFP, l'anticòs contra HA no mostrava cap senyal inespecífic. Tots els mutant estudiats, tant els lleus com els severes, quedaven retinguts al voltant del nucli amb més o menys grau. Aquest resultat correlacionava amb el que s'esperava dels mutants intermitjos-severs, però no del mutant lleu S246R. La mutació S246R que, en els estudis anteriors es comportava com el wt, en aquest sistema semblava ser més severa, ja que la colocalització a membrana era més baixa del que s'esperava.

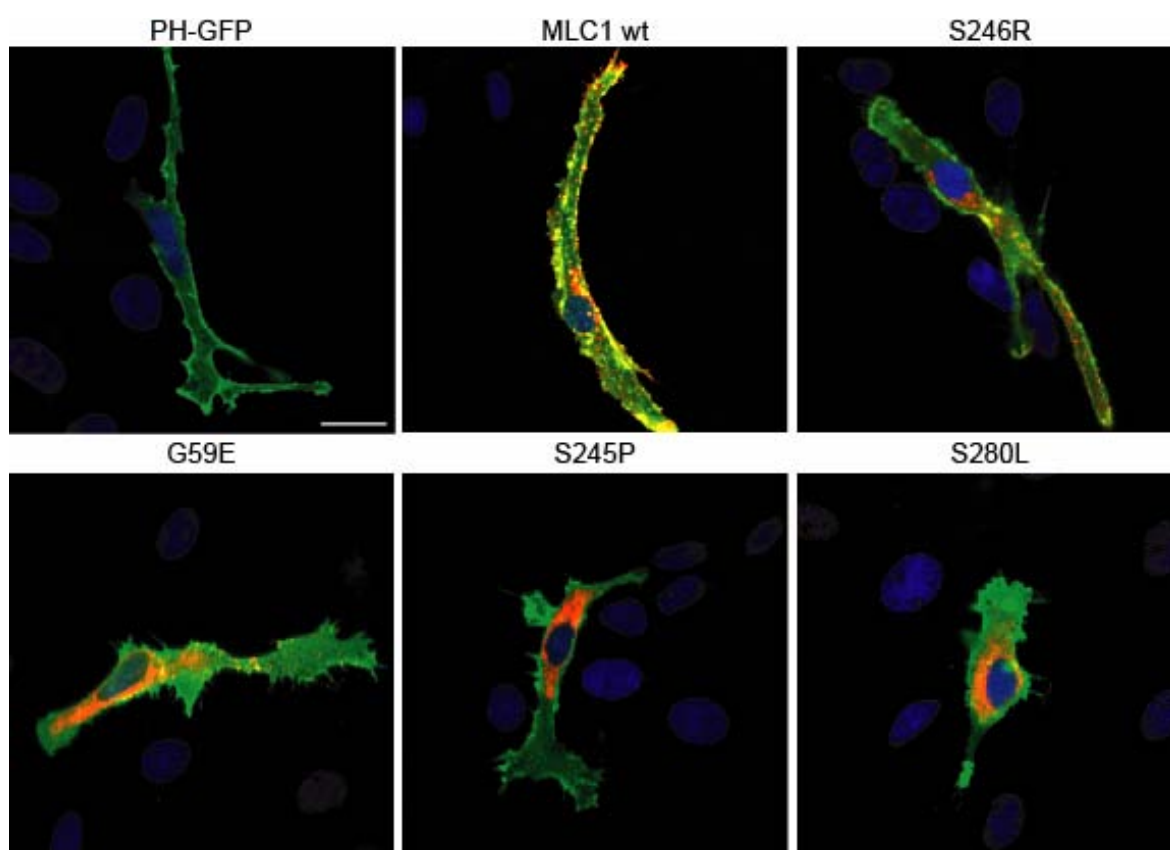


Figura 51. Immunocitoquímica d'un cultiu d'astròcits cotransfectats amb la PH-GFP (verd) i MLC1 wt o els mutants S246R, G59E, S245P i S280L, detectats amb l'anticòs HA (en vermell). La colocalització es mostra en groc i els nuclis tenyits amb dapi (blau). Barra, 20 μ m.

La quantificació de la colocalització de les imatges es va fer utilitzant el coeficient de correlació de Pearson (Rr) del software ImageJ (n=10 cèl·lules, 2 experiments independents). Els valors de Rr que es van obtenir van ser per: MLC1 $0,8 \pm 0,02$; S246R $0,6 \pm 0,04$; G59E $0,5 \pm 0,07$; A245P $0,4 \pm 0,05$; i S280L $0,4 \pm 0,07$.

1.2. Caracterització del mutant S246R en astròcits utilitzant Adenovirus

Per tal d'estudiar aquest augment en la severitat del fenotip de la mutació S246R, i degut a la baixa eficiència de transformació que presenten els astròcits primaris en cultiu, es va optar per treballar amb adenovirus (AdV). Aquest sistema permetia tenir una infecció del 100% de les cèl·lules i gràcies al promotor CMV, uns bons nivells d'expressió de les proteïnes.

Inicialment, es va fer una prova d'infecció i d'expressió en el model d'astròcits. Aquests van ser infectats a una multiplicitat d'infecció (MOI) de 0.1, 0.2, 1, 2 i 3 i no es van infectar com a control; i es van analitzar per WB amb l'anticòs contra l'epítip HA. En la figura 52 (A), es mostra el WB on es pot observar que a igual MOI, el mutant sempre presentava uns nivells d'expressió proteica inferiors respecte MLC1 wt, que anaven del ~70% a les MOIs més petites fins al ~20% a MOI 3. A partir d'aquest punt, tots els experiments es van realitzar a MOI 2.

La quantificació de l'arribada de la proteïna a la superfície de la membrana es va detectar amb l'anticòs contra HA sense permeabilitzar les cèl·lules. En la gràfica (figura 52, B) s'observa uns nivells a membrana del mutant significativament menors respecte el wt. El control donava un fons de luminiscència que es va restar dels valors. En 6 experiments independents (n=24), els nivells de proteïna a membrana del mutants S246R en comparació al wt, eren de $26 \pm 5\%$. Aquest resultat correlacionava amb l'apartat anterior de localització, on es mostrava que el mutant S246R quedava retintut al RE, però segurament agreujat per la menor expressió de la proteïna respecte el wt.

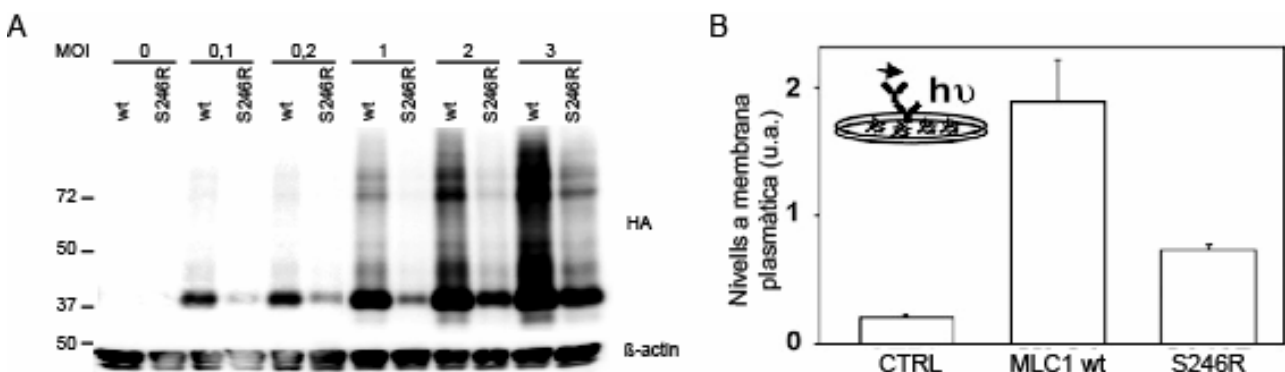


Figura 52. Expressió de MLC1 i el mutant S246R en el model d'astròcits. (A) Expressió proteica de MLC1 wt i el S246R a les MOIs indicades (25 µg prot/carril, anti-HA 1:500) per WB d'un experiment independent representatiu. A iguals MOIs, l'expressió de S246R és sempre més baixa que l'expressió de MLC1 wt. L'actina s'usa com a control de càrrega (1:10000). (B) Nivells de proteïna a la membrana plasmàtica. Els astròcits són infectats a MOI 2 amb l'AdV que expressa MLC1 wt i S246R, i els nivells de proteïna a membrana mesurats amb el mètode de luminiscència usant l'anticòs contra l'epítip HA extracel·lular. S246R té uns nivells de proteïna a la membrana del $26 \pm 5\%$ en comparació a MLC1 wt. La gràfica corresponen a un experiment independent (n=4) i està expressat en unitats arbitràries (u.a.). L'esquema interior és una representació del mètode.

Els AdVs es van provar per immunofluorescència per tal d'obtenir informació visual de la localització del mutant en el model astrocitari, i alhora, per provar els nivells d'expressió que s'obtenien per immunocitoquímica. Com s'observa en les imatges de la figura 53, en els astròcits que sobreexpressaven MLC1 wt, la proteïna es localitzava principalment a membrana en contacte

entre dos astròcits (processos astrocitaris) i en vesícules citoplasmàtiques. En canvi, el marcatge de S246R era majoritàriament perinuclear i en agregats citoplasmàtics, pràcticament sense arribar a la membrana. Aquest resultat recolzava els baixos nivells de proteïna a membrana detectats en l'estudi anterior. Com a observació curiosa, els astròcits que sobreexpressaven MLC1 wt semblaven ser més grans que els que expressaven el mutant.

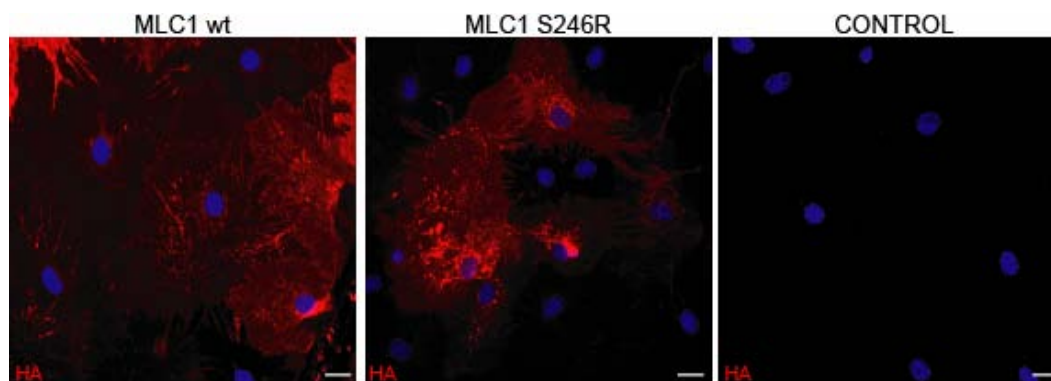


Figura 53. Immunocitoquímica d'un cultiu mixt d'astròcits i neurones infectats amb l'AdV que expressa la proteïna MLC1 wt i el mutant S246R a MOI 1, detectades amb l'anticòs contra HA (1:500). No es detecta senyal de l'anticòs en el cultiu no infectat (control). En els astròcits infectats amb l'AdV MLC1 wt, la localització de MLC1 (en vermell) és a processos astrocitaris en contacte entre dos astròcits i en vesícules citoplasmàtiques, mentre que la localització del mutant S246R és majoritàriament perinuclear. Nuclis tenyits amb Dapi (en blau). Barra, 20µm.

1.3. Estabilitat proteica del mutant S246R respecte el MLC1 wt

Per estudiar l'efecte que causava la mutació sobre l'estabilitat de la proteïna, inicialment es va monitoritzar l'estabilitat i la velocitat de degradació de les dues proteïnes utilitzant un inhibidor de la síntesi proteica, la cicloheximida (chx, 100 µg/ml).

Els astròcits es van infectar amb l'AdV MLC1 wt i S246R, i es van tractar amb chx durant 0, 1, 3 i 6h. Com s'observa en el WB (figura 54, A), MLC1 era força estable i només es començava a veure una petita reducció a partir de les 6h de tractament. El mutant S246R tenia una estabilitat reduïda, disminuint un ~70% a les 3h de tractament. Els resultats es resumeixen en la gràfica de la quantificació de les bandes amb el software ImageJ (B), on es podia observar, a partir d'1h després del tractament, una disminució dels nivells de la proteïna mutada, arribant al màxim a les 3h.

Per tal d'estudiar l'estabilitat del mutant a la membrana, es van infectar els astròcits amb els AdVs MLC1 i S246R i es van tractar durant 6h amb la chx. Els nivells de proteïna a membrana es van detectar pel mètode de luminiscència amb l'anticòs HA. Com es mostra a la gràfica (figura 54, C), el nivell a membrana de MLC1 wt va ser reduït fins al $59,3 \pm 4,1\%$, i el mutant fins el $35,1 \pm 7,1\%$.

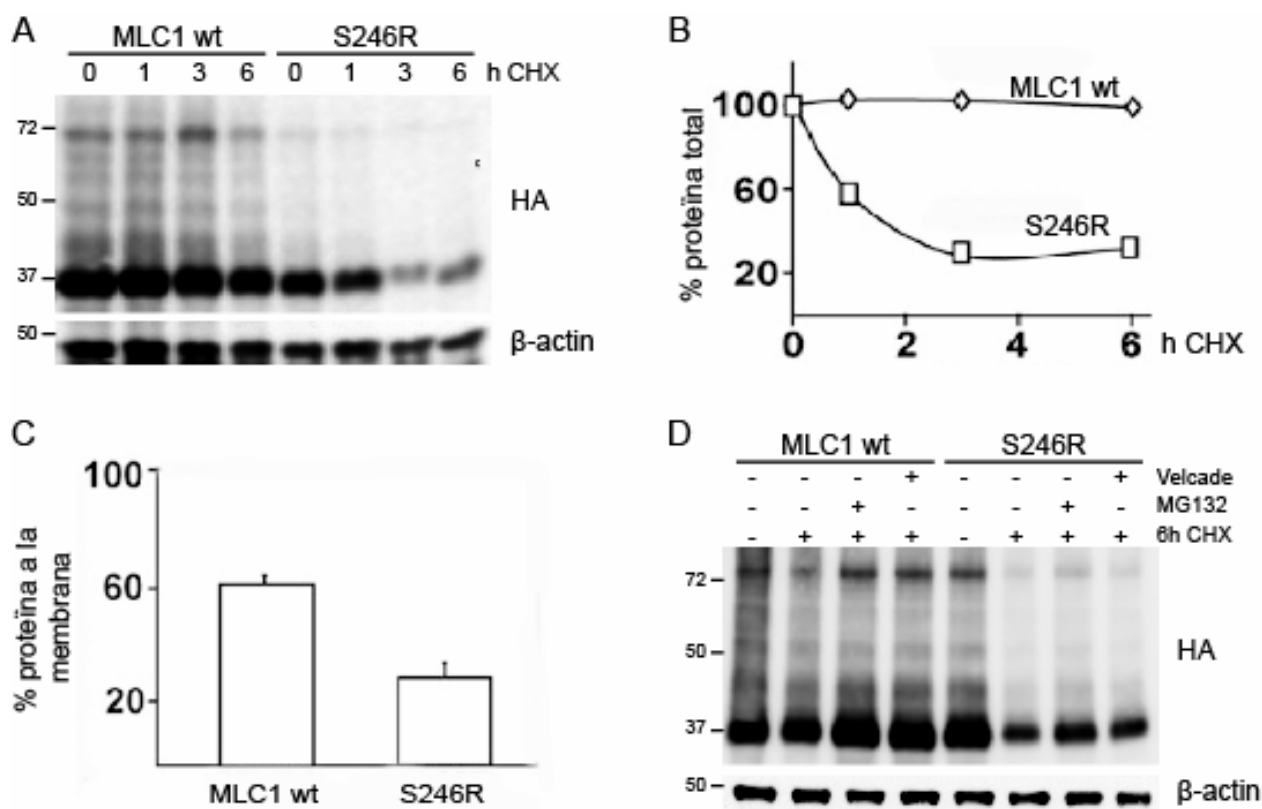


Figura 54. Estabilitat proteica i nivells de proteïna a membrana. (A) Astròcits infectats amb l'AdV MLC1 wt i S246R a MOI 2 van ser o no tractats 1, 3 i 6 h amb cicloheximida (chx, 100 µg/ml) i les mostres es van analitzar per WB (25 µg proteïna per carril) amb l'anticòs anti-HA (1:500). Els nivells d'expressió de MLC1 wt es mantenen estables començant a reduir-se a partir de les 6h. En canvi, els nivells de proteïna del mutant S246R comencen a disminuir a 1h de tractament amb chx, caient fins el 70% a les 3h. (B) Quantificació del WB amb el software ImageJ. Es mostra un experiment representatiu de 3 experiments independents. (C) Detecció dels nivells de proteïna a membrana pel mètode de luminiscència després de tractar les cèl·lules amb chx 6h. Es mostra una caiguda dels nivells de proteïna quedant el 59,3 ± 4,1% en el cas del MLC1 wt, i de 35,1 ± 7,1% en el cas del mutant. (D) WB on es mostra la recuperació parcial dels nivells de proteïna quan es tracten les cèl·lules amb chx 6h, combinat amb els inhibidors del proteasoma (MG132, 50 µg/ml; Velcade, 1 µg/ml), on s'observa en ambdós casos una recuperació parcial en els nivells de proteïna total. Com a control de càrrega s'ha utilitzat l'actina.

Aquesta estabilitat reduïda podia ser deguda a un augment en la degradació via proteasoma i lisosoma, com ja mostraven els resultats en cèl·lules HeLa. Per tal de comprovar-ho, es van tractar els astròcits amb dos inhibidors del proteasoma, el Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132, Sigma) i bortezomib o Velcade, producte comercial utilitzat en pacients amb mieloma múltiple que actua inhibint el proteasoma.

Els astròcits infectats amb els AdVs van ser tractats durant 6h amb la chx i amb els inhibidors MG132 (50 µg/ml) o Velcade (1 µg/ml). Com es mostra al WB de la figura 54 (D), no s'observava cap canvi en els nivells de la proteïna MLC1 wt en el cultiu tractat amb la chx, mentre que el tractament amb els inhibidors del proteasoma, feia augmentar els nivells de la proteïna MLC1 al voltant d'un 15%. En el cas del mutant S246R, el tractament de les cèl·lules amb la chx durant 6h, provocava que els nivells de proteïna total disminuïssin fins al 50%, i només s'observava una recuperació parcial en els nivells d'expressió del mutant d'un 20% en el cas de l'inhibidor MG132, i d'un 10% en presència de Velcade.

2. EXPRESSIÓ DE MLC1 EN PACIENTS DE MLC

El grup de la Dra. Marjo Van de Knaap (Holanda) (Boor et al., 2005) va trobar l'expressió de MLC1 en leucòcits humans per immuno-marcatge i citometria de flux. Per això, i degut a la dificultat d'obtenir mostres de cervells humans de pacients de MLC, vam creure convenient estudiar si podríem detectar la proteïna en aquests tipus cel·lulars, ja que si era així, es podria utilitzar com a eina d'estudi i diagnòstic dels pacients. El Dr. Elon Pras (Israel) ens va cedir linfòcits immortalitzats de 3 pacients amb MLC (linfòcits control CRG, 6738 corresponent a un pare heterozigot, 6739 mare heterozigot i EP-1 fill afectat de MLC homozigot per la mutació G59E), però no es va poder detectar la proteïna per WB (figura 55, A).

2.1. Expressió de MLC1 en PBLs

L'expressió del gen *MLC1* es detectava en leucòcits de sang perifèrica (PBLs). Per això, en col·laboració amb el grup del Dr. Joan Gil (UB) el qual ens va cedir mostres control de PBLs (formats per monòcits i linfòcits), es va realitzar un estudi de MLC1 per WB en aquest tipus cel·lular (figura 55, A). Vam detectar una banda a ~37 kDa corresponent a MLC1 a PBLs, mentre que no apareixia cap banda a les línies linfocitàries dels pacients. El WB dels dos tipus cel·lulars que formen els PBLs (B), mostrava que la fracció de monòcits (Mon) estava enriquida amb MLC1 en comparació amb la fracció linfocitària (Linf). Vam escollir llavors, aquest tipus cel·lular per fer l'estudi la proteïna MLC1 en pacients afectats amb MLC.

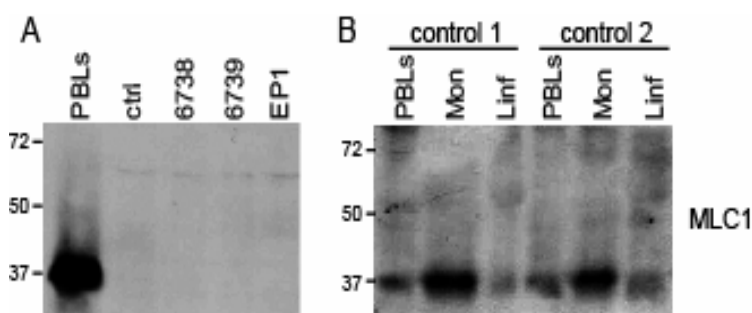


Figura 55. Estudi de l'expressió de MLC1 en leucòcits de sang perifèrica. (A) WB on es detecta MLC1 a PBLs amb l'anticòs N4 (1:100), mentre en les línies linfocitàries immortalitzades de pacients no es detecta cap banda. (B) Separació de les PBLs en monòcits (Mon) i linfòcits (Linf) de dues mostres control diferents, on hi ha una detecció enriquida de la proteïna MLC1 a monòcits.

2.2. Estudi dels mutants de MLC1 en pacients de MLC

Un cop determinat el tipus cel·lular idoni per l'estudi de les mutacions en el gen *MLC1* en pacients es van analitzar, en col·laboració amb la Dra. Marjo van der Knaap (Holanda), la proteïna MLC1 en diverses mostres procedents de pacients afectats amb MLC.

El primer estudi es va realitzar amb mostres d'un pacient (EL18) del qual no es coneixia la mutació, però es disposava d'una biòpsia cerebral. El pacient pertanyia a una família que mostrava lligament amb el locus de *MLC1*, i l'anàlisi del mRNA per RT-PCR confirmava la reducció de l'expressió de MLC1 a limfoblast immortalitzats. La mostra de cervell corresponia a la neoescorça i a la substància blanca subcortical, mentre que la mostra control provenia d'una

autòpsia d'un individu sa. Els monòcits procedents del pacient EL18 es van analitzar per WB, com es pot comprovar a la figura 56 (A). La banda de 35 kDa, corresponent al pes de la proteïna MLC1 detectada en el control, no es detectava en el pacient EL18. L'estudi en el teixit cerebral per immunohistoquímica, mostrava l'expressió de MLC1 al voltant de vasos sanguinis en el control (fletxes en la figura 56, B), mentre que no es detectava la proteïna a la mostra procedent del pacient EL18.

Per comprovar si l'absència de la proteïna MLC1, detectada en el pacient EL18, era un fenomen comú en altres mutacions, es va ampliar l'estudi a tres pacients més. Les mostres corresponien als monòcits dels pacients amb les mutacions: S246R/S246R (mutació en homozigosi classificada com a lleu), G212R/423+3insT i C125R/V210D (mutacions en heterozigosi severes). El WB (figura 56, C) mostrava la banda corresponent a MLC1 en el control de cervell humà i en el control de monòcits (ctrl), però aquesta banda desapareixia en les mostres dels pacients amb les diferents mutacions. El fet de no detectar MLC1 en els pacients afectats amb MLC ens va suggerir que les mutacions causen un defecte en l'expressió de la proteïna, fenomen comú a totes les mutacions.

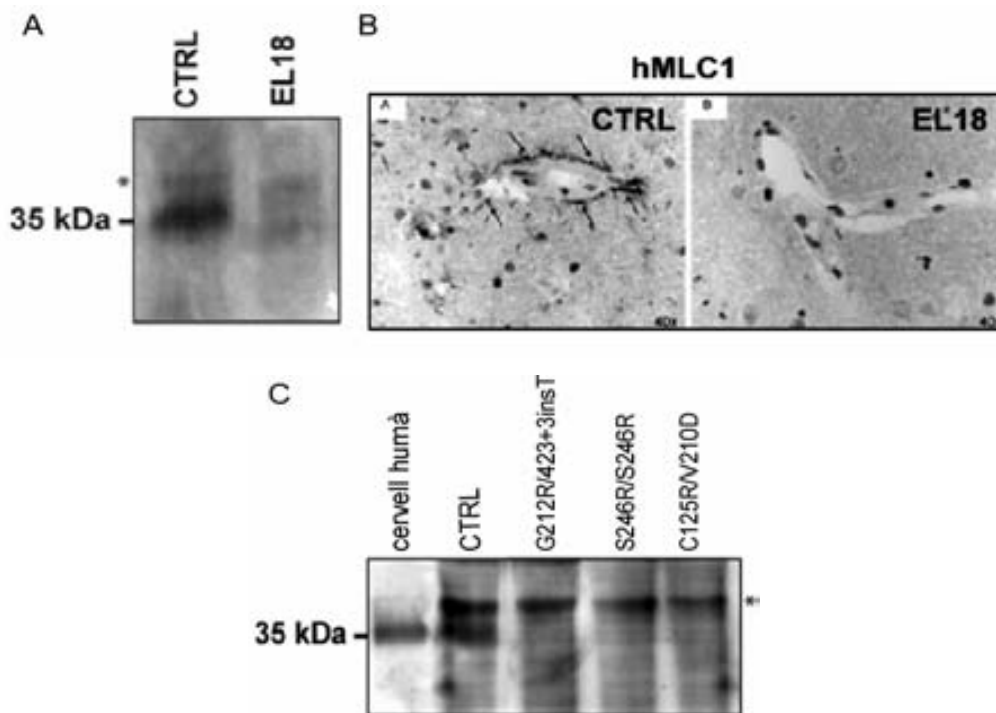


Figura 56. Estudi de MLC1 en pacients de MLC. (A) Monòcits d'un pacient sa (ctrl) i d'un pacient afectat per MLC (EL18) analitzat per WB amb l'anticòs contra la proteïna humana MLC1 N4 (1:50). La banda corresponent a MLC1 detectada a la mostra control desapareix en la mostra del pacient EL18. (B) Tinció de MLC1 per immunohistoquímica de teixit cerebral d'un pacient control i del pacient afectat EL18. En el teixit control, MLC1 dona un senyal perivascular (fletxes) que no s'observa en el teixit del pacient EL18. (C) Estudi de MLC1 en monòcits d'un altre pacient sa control (ctrl) i 3 pacients de MLC amb diferents mutacions. La banda que apareix a 35 kDa corresponent a MLC1 (ctrl) desapareix en els 3 pacients afectats. Com a control extern s'ha utilitzat una mostra de teixit cerebral on detectem la banda corresponent a MLC1. L'anticòs detecta una banda inespecífica per sobre la banda corresponent a MLC1 (asteriscs en A i C).

3. DISCUSSIÓ

Aquest capítol ens amplia els coneixements sobre el defecte en el mecanisme molecular causat per les mutacions de la proteïna MLC1 (annex 4, Duarri et al., 2008). Les dades suggereixen que els mutants queden retinguts a compartiments intracel·lulars perinuclears, segurament al reticle endoplasmàtic, com indiquen els estudis de glicosilació. Aquests resultats concorden amb les dades publicades recentment pel grup de la Dra. Elena Ambrosini (Lanciotti et al., 2010), on també mostren la retenció dels mutants S246R i S280L en el reticle endoplasmàtic. Hipotetitzem que aquesta retenció està causada per un defecte en el plegament de la proteïna, ja sigui a nivell d'estructura o a nivell d'oligomerització, ja que amb l'ajuda de xaperones químiques es pot rescatar part de l'expressió de la proteïna.

També ens aporta informació sobre l'estudi bioquímic dels efectes de les mutacions de MLC1 en diferents sistemes, com s'ha demostrat en el cas del mutant S246R. Aquesta proteïna mutada es comporta de manera similar al wt pel què fa a expressió i localització en sistemes permissius, com en oòcits de *xenopus* o en cèl·lules HeLa, on la maquinària de control de la qualitat de les proteïnes pot fer que variï la severitat de les diferents mutacions. En el sistema utilitzat en aquest apartat, com són els astròcits primaris de rata, on MLC1 s'expressa de forma endògena, el control del plegament i trànsit de la proteïna segurament està més regulat i és més exigent. Així, una mutació que anteriorment s'havia considerat com a lleu, s'agreuja.

El fet de no detectar l'expressió de la proteïna MLC1 en pacients de MLC és un resultat que concorda amb el fenotip recessiu de la malaltia, informació que ens confirma que el senyal que detectem amb els nostres anticossos, tant per WB com per IF, és específica de MLC1. També hem demostrat que, l'anàlisi de MLC1 en monòcits procedents de sang perifèric dels pacients, pot utilitzar-se com a eina de diagnòstic de la malaltia.

CAPÍTOL 5. MODELS CEL·LULARS *KNOCK-DOWN* I DE SOBREEXPRESSIONI DE MLC1

Degut a que el model de ratolí *knock-out* condicional de MLC1 estava en desenvolupament, es va creure convenient intentar obtenir un model astrocitari *knock-down* de MLC1, mitjançant RNA d'interferència (microRNAs) contra la proteïna, per tal d'avançar en el coneixement de la bioquímica i la possible funció de MLC1.

1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL ASTROCITARI *KNOCK-DOWN* DE MLC1

Per obtenir el model *knock-down* de MLC1 es va fer servir la tecnologia dels microRNAs (miRNAs), i els adenovirus per introduir els miRNAs a les cèl·lules. L'avantatge més important, i pel qual es va triar aquest sistema, va ser perquè el model astrocitari presentava uns nivells de transfecció de ~20%, insuficients per generar un *knock-down*. Els adenovirus ens van permetre el 100% d'infecció, important en el nostre cas, ja que MLC és una malaltia recessiva i, per tant, es necessita una reducció total de la proteïna perquè es manifesti el fenotip.

1.1. Caracterització dels miRNAs en el model astrocitari

El primer pas va ser la caracterització del funcionament dels miRNAs en el model astrocitari de rata mitjançant les tècniques de WB, IF i RT-PCR. Es va fer una dosi resposta a diferents MOIs, i a diferents temps a una determinada MOI, per veure la disminució dels nivells de proteïna en un cultiu d'astròcits.

Es van infectar el cultiu d'astròcits amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 a MOI 2 i es van incubar durant 2, 5, 8 i 11 dies. Es pot observar que MLC1 (figura 57, A) començava a caure a partir dels 2 dies, però no era fins als 8 dies on la detecció de la proteïna era pràcticament nul·la pels miRNAs 756 i 905. El miRNA SCR, utilitzat com a control, no provocava cap alteració en els nivells de proteïna quan es comparava amb el control (astròcits sense tractar). Per altra banda, es van infectar els astròcits amb els AdVs miRNAs a MOIs 0.5, 1 i 2 i es van incubar durant 7 dies. El WB (B) ens mostrava que els nivells de proteïna començaven a caure a MOI 0.5 però no era fins a MOI 2, que la caiguda de la proteïna amb els miRNAs 756 i 905 era pràcticament total; mentre que el miRNA 2088 no era capaç de bloquejar l'expressió de MLC1. Un cop comprovat que els miRNAs funcionaven per WB, es va fer el seguiment per immunocitoquímica. La figura 53 (C) mostrava que aquelles cèl·lules infectades amb els miRNAs no expressaven MLC1, i que el miRNA SCR no provocava cap efecte en la localització de la proteïna.

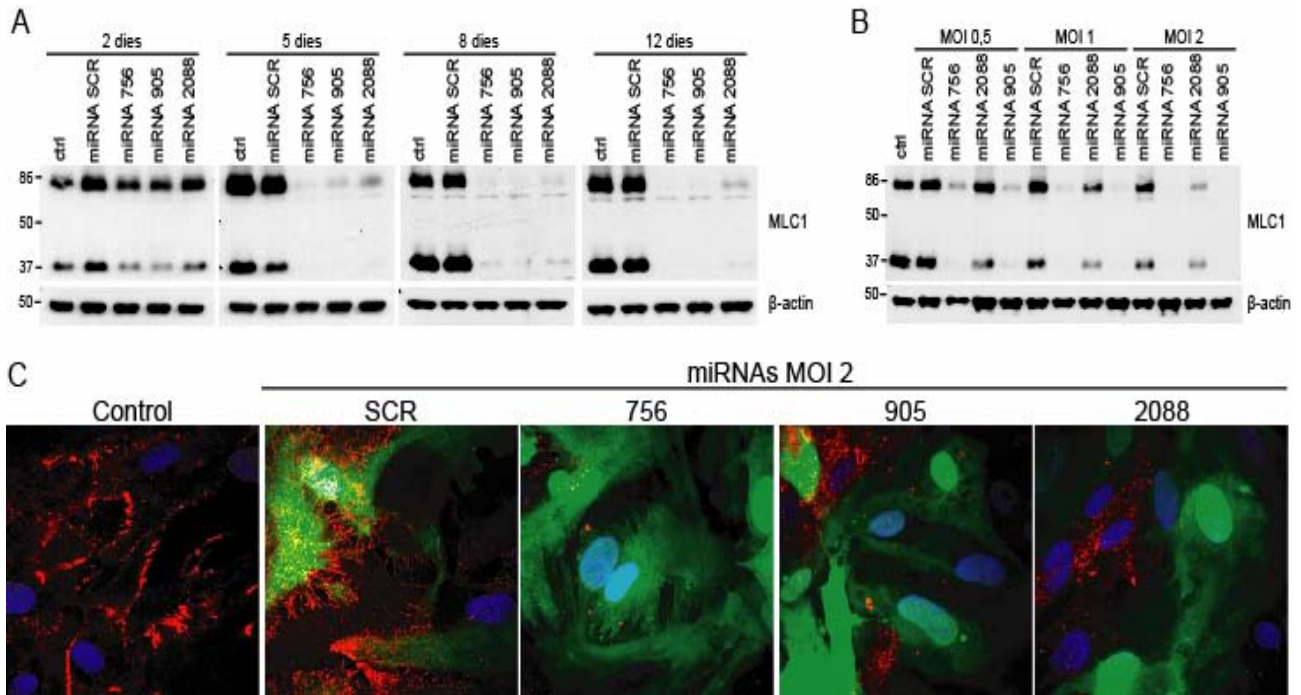
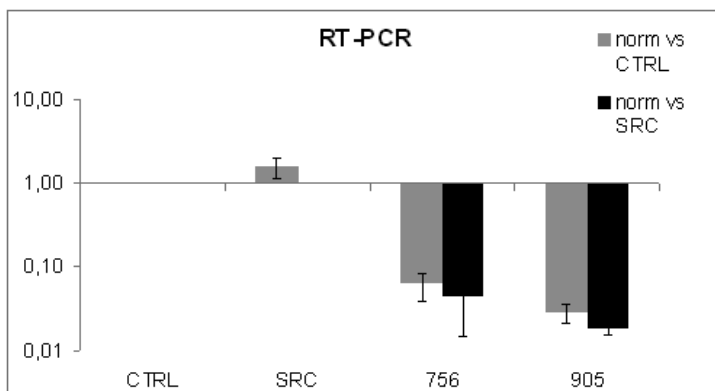


Figura 57. Anàlisi de la reducció de l'expressió de la proteïna MLC1 utilitzant els miRNAs. (A) Astròcits no infectats o infectats a MOI 2 amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 durant 2, 5, 8 i 12 dies i analitzats per WB. (B) Astròcits no infectats o infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 a MOIs 0.5, 1 i 2 a 7 dies. L'actina s'usa de control de càrrega. (C) Immunohistoquímiques del model astrocitari infectat amb els AdVs miRNAs (a MOI 2 durant 7 dies) per analitzar l'expressió de MLC1. El control són astròcits sense infectar on podem detectar MLC1 (en vermell) a les unions entre astròcits igual que els astròcits amb el miRNA SCR. Els miRNAs 756, 905 i 2088 produeixen una disminució del marcatge de MLC1 en aquells astròcits infectats (verd). Barra, 20 µm.

En aquestes mateixes condicions es va voler comprovar per RT-PCR si els miRNAs disminueixen els nivells de RNA missatger (mRNA). Aquests estudis es van fer en col·laboració amb el Dr. Miguel López de Heredia (IDIBELL). La RT-PCR (gràfica 6) va mostrar que, efectivament, els nivells d'expressió del mRNA, en comparació als valors del control, es redueixen el $93,9 \pm 2,2\%$ amb el miRNA 756, i el $97,1 \pm 0,8\%$ amb el 905 ($p < 0,001$), en canvi, el miRNA SCR no produïa un efecte significatiu en els nivells d'expressió de MLC1.



Gràfica 6. Estudi dels nivells de mRNA de MLC1 per RT-PCR del model astrocitari, no infectat o infectat amb els AdVs miRNAs SCR, 756 i 905 a MOI 2 durant 7 dies. Les dades es representen en comparació amb el control (gris, astròcits sense infectar) o en comparació amb el miRNA SCR (negre).

Els resultats es indicaven que, a MOI 2 es corria el risc de que no s'infectessin totes les cèl·lules i, per això, es va fer el seguiment de MLC1 per immunocitoquímica a unes MOIs més elevades (figura 58). Es van infectar astròcits amb els AdVs a MOIs 1, 10 i 20 amb els AdVs miRNA SCR i 905. Els resultat va ser que, a mesura que augmentàvem la MOI, el miRNA SCR no provocava cap alteració en MLC1 ni cap canvi morfològic a la cèl·lula, mentre que el miRNA 905 disminuïa els nivells d'expressió de la proteïna, i a partir de MOI 10, les cèl·lules es feien més petites i apareixien vacuoles intracel·lulars.

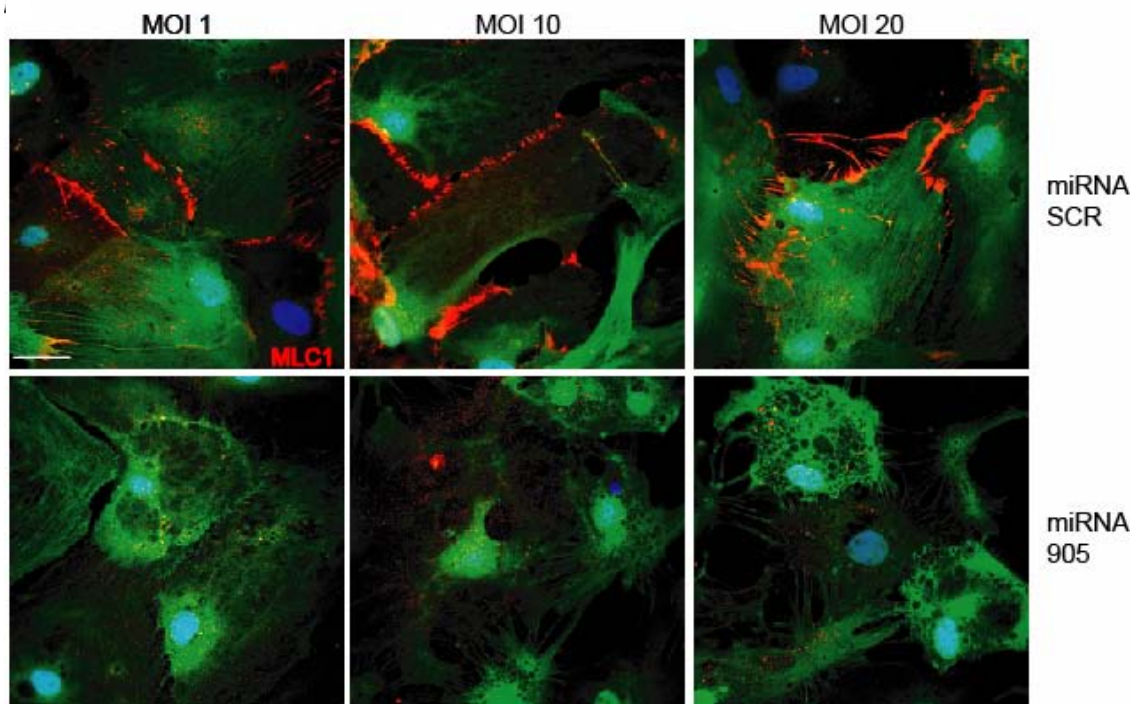


Figura 58. Estudi dels canvis en la morfologia dels astròcits deficitaris de MLC1. (A) El model astrocítari es va infectar amb els AdVs miRNA SCR i 905 a unes MOIs superiors (1, 10 i 20) a 7 dies. La IF detectant MLC1 (vermell) mostra que el miRNA SCR no afecta a la localització de MLC1 a MOIs elevades en canvi, el miRNA 905 produeix una disminució del senyal de MLC1 i un canvi en la morfologia cel·lular, més evident a MOI 20. Barra, 20µm.

Aquest fenotip ens va fer preguntar si les cèl·lules estaven apoptòtiques, però una tinció amb caspasa-9 va donar negatiu (dades no mostrades). Igualment, es va comprovar que infectant els astròcits amb els AdVs miRNAs des del començament del cultiu, i deixant els astròcits 3 setmanes parats, els miRNAs no produïen una mortalitat superior als astròcits sense infectar.

1.2. Estudi de les unions astrocitàries en el model *knock-down*

Un cop establertes les condicions del model astrocítari *knock-down*, vam mirar si la manca de MLC1 en als astròcits afectava les proteïnes de les unions descrites en el capítol 3. Per això, els astròcits infectats amb els AdVs miRNA SCR i 905 a una MOI 5 es van analitzar per IF amb els anticossos contra β -catenina (unions adherents), CX43 (unions gap), ZO-1 i ocludina (unions *tight*) (en vermell). Com mostra la figura 59, la localització de β -catenina a les unions no variava, igual que passava amb les altres proteïnes d'unions ZO-1, ocludina i CX43.

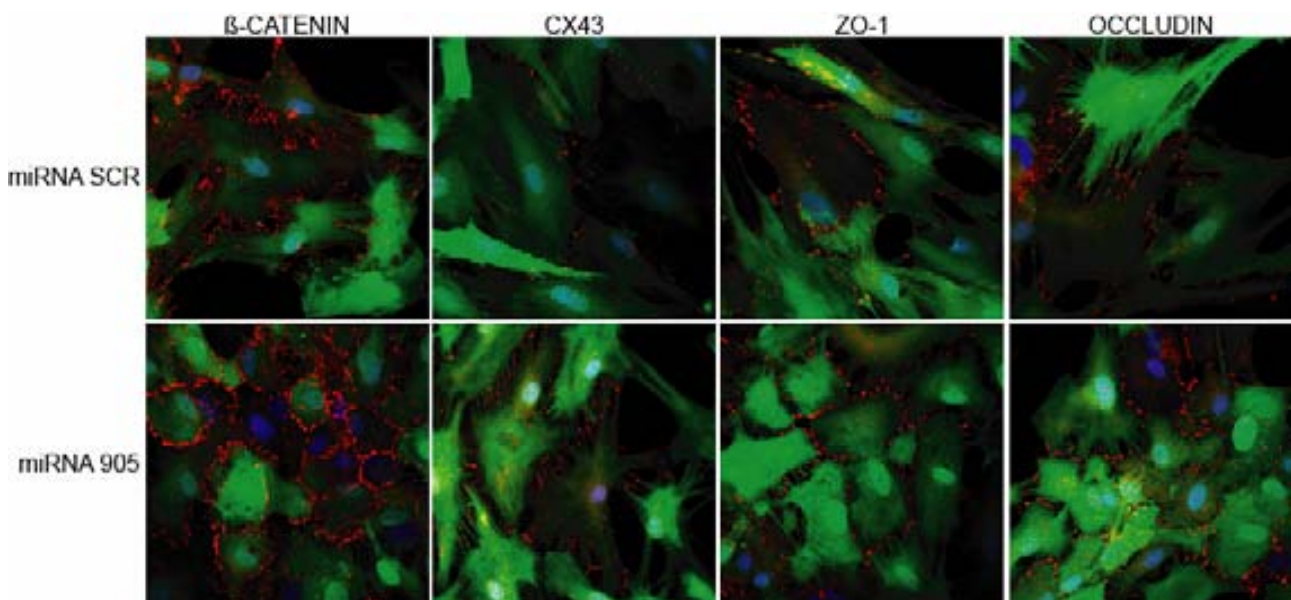


Figura 59. Estudi de les unions astrocitàries en absència de MLC1. Els astròcits es van infectar amb els AdVs miRNA SCR i 905 (en verd) a MOI 5 durant 7 dies i la IF es va realitzar amb els anticossos contra β -catenina, CX43, ZO-1 i occludina (en vermell). Barra, 20 μ m.

També es van mirar els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes, per WB en extractes d'astròcits deficients de MLC1, però no es van observar canvis en la seva expressió en comparació amb els astròcits control.

2. MODEL DE COMPLEMENTACIÓ I MORFOLOGIA CEL·LULAR

Per comprovar si els efectes observats en la morfologia cel·lular dels miRNA eren específics del dèficit de la proteïna MLC1, primer es va provar si la complementació expressant la proteïna MLC1 humana era possible, i no es veia afectat pels miRNAs (ja que les seqüències eren una mica diferents), i, seguidament, si amb la complementació podíem recuperar el fenotip dels astròcits.

2.1. Model de complementació

Es van infectar els astròcits amb els AdVs a MOI 2 que expressaven MLC1 de ratolí (mMLC1) i MLC1 humà amb l'epítip HA (HAhMLC1), i com a controls es van utilitzar els AdVs que expressaven la proteïna LacZ i el mutant de HAhMLC1 S246R. 48h després de la infecció, es va mirar l'expressió de MLC1 per WB i la localització per immunocitoquímica.

El WB (figura 60, A) va mostrar que al detectar els nivells d'expressió de la proteïna MLC1 amb l'anticòs contra MLC1 (ratolí), l'AdV LacZ no tenia cap efecte sobre l'expressió de MLC1 en comparació amb els astròcits control, mentre que la sobreexpressió de mMLC1 feia augmentar el senyal un 175%. L'anticòs contra MLC1 de ratolí pràcticament no detectava la proteïna humana, com es veu en la sobreexpressió de HAhMLC1 i el mutant S246R. Quan es detectava amb

l'anticòs contra HA es podia observar una banda intensa en les mostres que sobreexpressaven HAhMLC1, i en menor intensitat, el mutant S246R.

La IF (figura 60, B) amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí mostrava que l'AdV LacZ no influïa en la localització de MLC1 comparada amb els astròcits control. La sobreexpressió del mMLC1 es podia detectar en els processos astrocitaris. La IF amb l'anticòs HA dels astròcits, on s'havia sobreexpressat HAhMLC1, detectava la proteïna humana als processos astrocitaris, mentre que el mutant S246R quedava retintut al voltant del nucli.

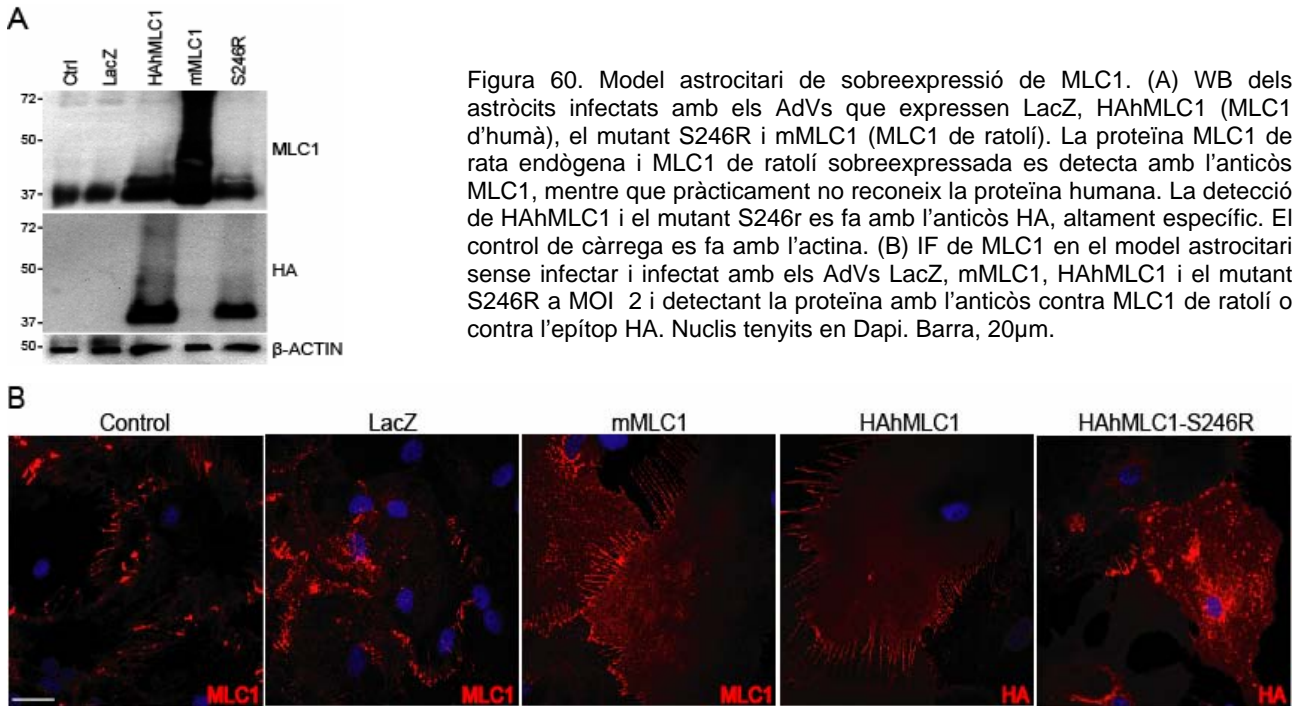
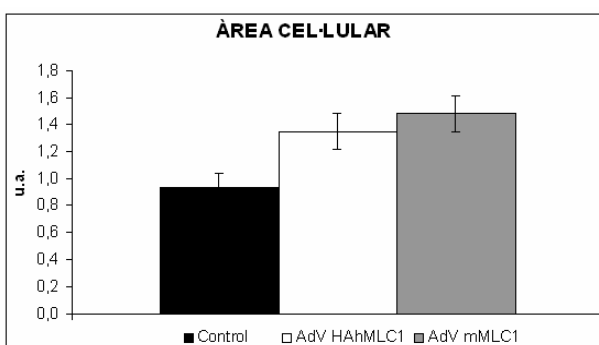


Figura 60. Model astrocitari de sobreexpressió de MLC1. (A) WB dels astròcits infectats amb els AdVs que expressen LacZ, HAhMLC1 (MLC1 d'humà), el mutant S246R i mMLC1 (MLC1 de ratolí). La proteïna MLC1 de rata endògena i MLC1 de ratolí sobreexpressada es detecta amb l'anticòs MLC1, mentre que pràcticament no reconeix la proteïna humana. La detecció de HAhMLC1 i el mutant S246r es fa amb l'anticòs HA, altament específic. El control de càrrega es fa amb l'actina. (B) IF de MLC1 en el model astrocitari sense infectar i infectat amb els AdVs LacZ, mMLC1, HAhMLC1 i el mutant S246R a MOI 2 i detectant la proteïna amb l'anticòs contra MLC1 de ratolí o contra l'epítip HA. Nuclis tenyits en Dapi. Barra, 20 μ m.

Com s'ha comentat en els capítols 3 i 4, els astròcits en quiescència tenien una mida superior als astròcits en creixement, i la sobreexpressió de MLC1 semblava que encara l'augmentava més. Per tal de quantificar la diferència de mida dels astròcits, es van adquirir diverses imatges a 20x de 3 experiments independents, i es van quantificar les àrees dels astròcits control i dels astròcits infectats amb l'AdV HAhMLC1 i mMLC1, amb el software ImageJ. Les àrees dels astròcits sobreexpressant MLC1 eren del $44 \pm 4\%$ per HAhMLC1 i del $58 \pm 5\%$ per mMLC1 més grans que l'àrea dels astròcits control ($p < 0,05$), com es mostra en la gràfica 7.



Gràfica 7. Quantificació de l'àrea cel·lular dels astròcits control comparada amb l'àrea dels astròcits que sobreexpressen MLC1 (infectats amb els AdVs mMLC1 i HAhMLC1 a una MOI 2) realitzada amb el software ImageJ.

El següent pas va ser comprovar si es podia complementar el defecte de MLC1 en els astròcits tractats amb els miRNAs, sobreexpressant HAhMLC1. El WB (figura 61, A) va mostrar que la sobreexpressió amb HAhMLC1 no estava afectada pels miRNAs (detectat amb l'anticòs contra HA). La IF (B) dels astròcits, infectats amb els AdVs miRNA 905 i 756, mostrava que el senyal de MLC1 desapareixia, en canvi, en els astròcits complementats amb HAhMLC1, es podia detectar la proteïna sobreexpressada (amb l'anticòs contra HA) a membrana.

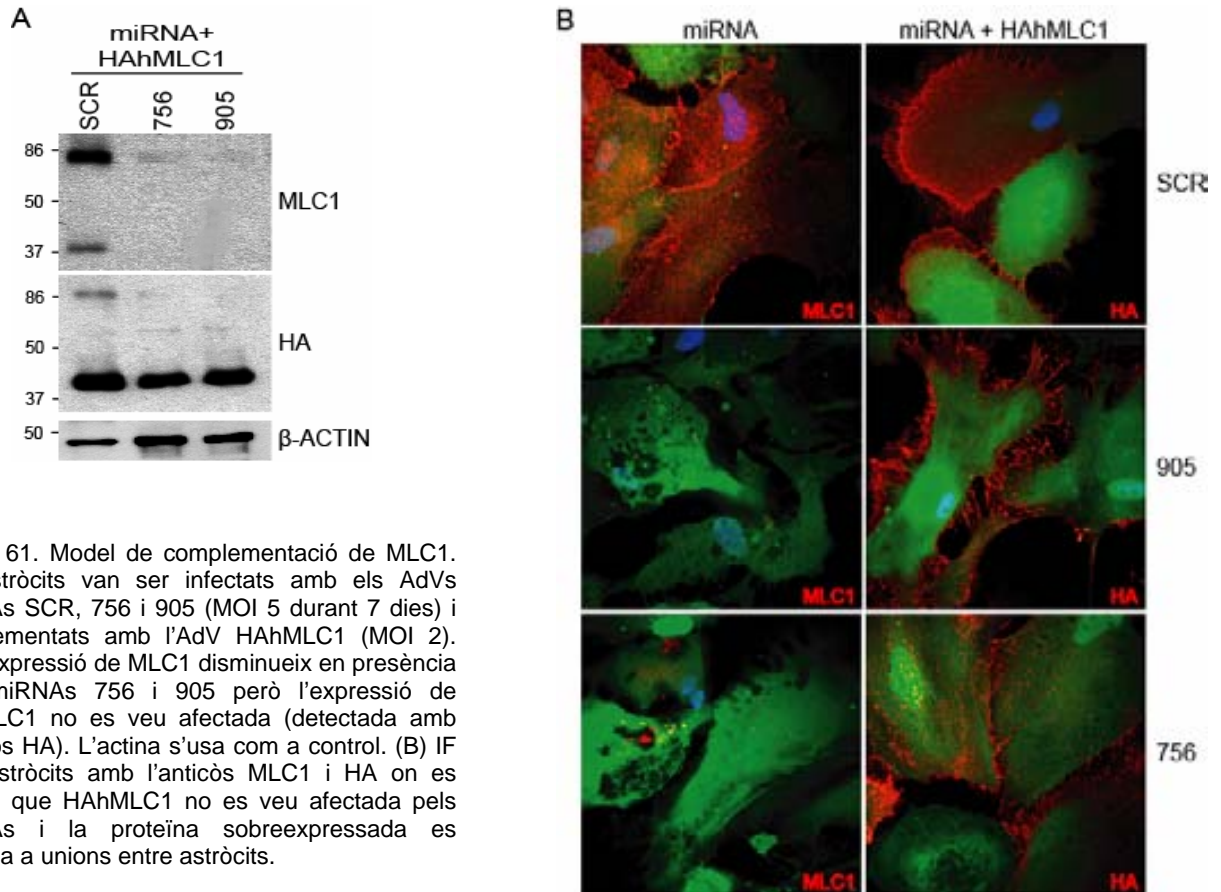
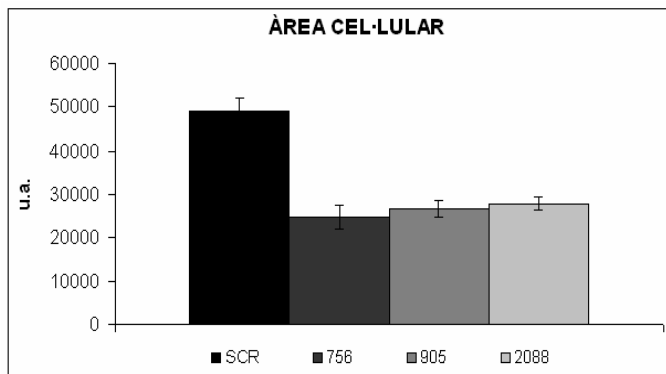


Figura 61. Model de complementació de MLC1. Els astròcits van ser infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 756 i 905 (MOI 5 durant 7 dies) i complementats amb l'AdV HAhMLC1 (MOI 2). (A) L'expressió de MLC1 disminueix en presència dels miRNAs 756 i 905 però l'expressió de HAhMLC1 no es veu afectada (detectada amb l'anticòs HA). L'actina s'usa com a control. (B) IF dels astròcits amb l'anticòs MLC1 i HA on es mostra que HAhMLC1 no es veu afectada pels miRNAs i la proteïna sobreexpressada es localitza a unions entre astròcits.

2.2. Morfologia cel·lular i vacuoles

Per tal d'estudiar, en detall, el canvi de fenotip cel·lular dels astròcits es va procedir a la quantificació tant de les àrees cel·lulars, com del número de cèl·lules que presentaven vacuolització de 3 experiments independents. La quantificació de l'àrea cel·lular es va fer amb el software ImageJ i, com es mostra a la gràfica 8, la mida dels astròcits es reduïa en un 50% en presència dels 3 miRNAs ($50.1 \pm 5.5\%$ pel miRNA 756 ($n=57$ cèl·lules), $54.1 \pm 3.7\%$ pel miRNA 905 ($n=86$) i $53.2 \pm 3.1\%$ pel miRNA 2088 ($n=70$)), respecte el control (100% pel miRNA SCR, $n=48$) ($p<0,05$).



Gràfica 8. Quantificació de l'àrea cel·lular, amb el software ImageJ, dels astròcits infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 a una MOI 5 durant 7 dies. Es pot observar una disminució > 50% de la mida dels astròcits amb els miRNAs 756, 905 i 2088 en comparació amb el miRNA SCR.

En la figura 62 es mostren les cèl·lules, s'hi pot veure que els 3 miRNAs provocaven la vacuolització dels astròcits, però el miRNA SCR no. També es van quantificar el número de cèl·lules que presentaven vacuoles, amb uns percentatges del $46,2 \pm 5,3\%$ pel miRNA 756, $43,4 \pm 18,6\%$ pel miRNA 905 i $42,8 \pm 4\%$ pel miRNA 2088 ($p < 0,05$), mentre que només un $4,2\%$ del total de les cèl·lules tenien vacuoles amb el miRNA SCR.

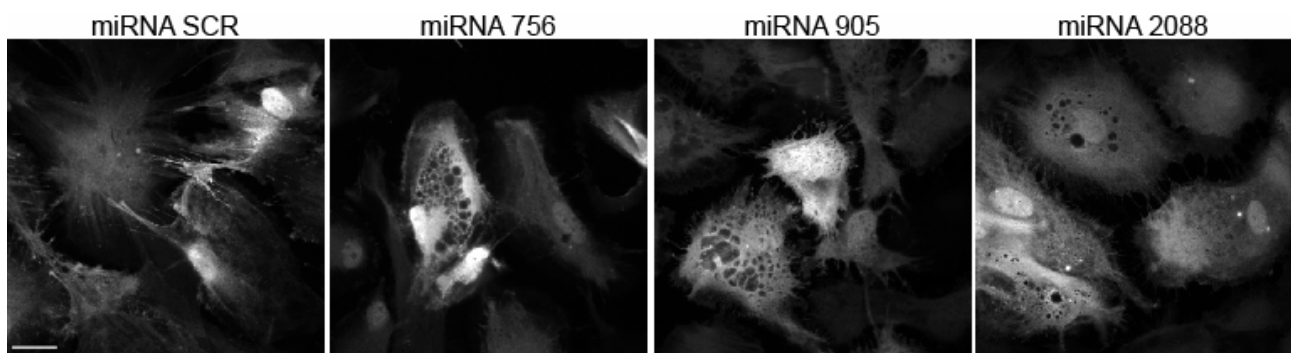
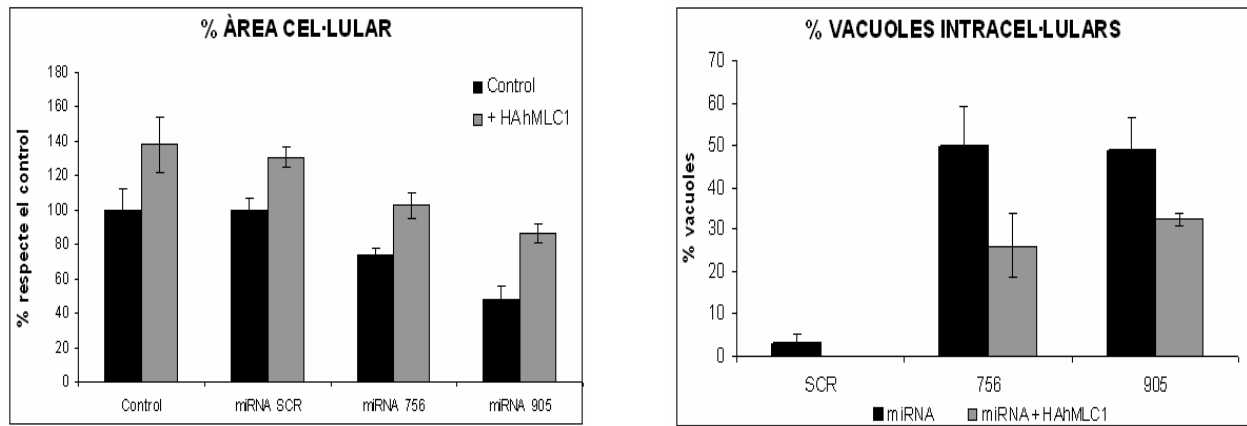


Figura 62. Imatges de fluorescència de la GFP corresponent als astròcits infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 756, 905 i 2088 a una MOI 5 durant 7 dies. Es poden observar vacuoles citoplasmàtiques en els astròcits deficientes de MLC1. Barra, 20µm.

Es va voler quantificar la recuperació del fenotip en el model de complementació amb HAhMLC1. Per això, es van quantificar les àrees (gràfica 9, esquerra) dels astròcits infectats amb els AdVs miRNAs SCR, 905 i 756 i complementats amb l'AdV HAhMLC1. Els resultats es van comparar amb un control d'astròcits sense infectar i infectats només amb HAhMLC1. Es va poder observar que la sobreexpressió de HAhMLC1 augmentava la mida dels astròcits, tant en astròcits control, com en presència del miRNA SCR. Quan es complementaven els astròcits deficientes de MLC1, l'àrea cel·lular augmentava fins als nivells dels controls. Resultats similars es van obtenir en el recompte d'astròcits vacuolitzats (gràfica 9, dreta). La complementació amb HAhMLC1 reduïa el nombre de cèl·lules amb vacuoles del $49.5 \pm 9.5\%$ al $26.2 \pm 7.6\%$ (47%) pel miRNA 756 i del $48.7 \pm 7.7\%$ al $32.3 \pm 1.4\%$ (35%) pel miRNA 905.



Gràfica 9. Recuperació del fenotip cel·lular del model de complementació. Esquerra, gràfica de la quantificació de l'àrea cel·lular dels astròcits amb o sense MLC1, on es mostra la recuperació de la mida cel·lular en el model de complementació (miRNAs 756 i 905 +HAhMLC1). Dreta, quantificació del número d'astròcits que presenten vacuoles citoplasmàtiques en absència de MLC1, També s'hi observa com disminueix el percentatge quan es complementa amb HAhMLC1.

2.3. Relació de MLC1 amb el volum cel·lular

El fet que els astròcits canviessin el seu volum cel·lular en presència o absència de MLC1 ens va fer pensar que MLC1 podria està implicat en processos relacionats amb el moviment de l'aigua cel·lular. Vam pensar que podíem estudiar aquesta relació a nivell d'expressió i localització de la proteïna MLC1 en el nostre model astrocitari. Per això, es van sotmetre els astròcits a diferents condicions extracel·lulars d'osmolaritat, per tal de provocar canvis en el volum de la cèl·lula.

Es van fer servir 3 solucions amb diferents osmolaritats, una solució fisiològica a 300 mOsm/kg d'aigua, una solució hipoosmòtica a 180 mOsm/kg i una hiperosmòtica a 500 mOsm/kg, amb les quals es van tractar els astròcits durant 24h a 37°C. En les dobles IF (figura 63, A), es podia observar que en condicions fisiològiques, MLC1 es trobava a unions colocalitzant amb ZO-1, mentre que, en condicions d'hipoosmolaritat i hiperosmolaritat, MLC1 s'internalitzava envoltant vacuoles citoplasmàtiques. L'expressió de MLC1 disminuïa, en condicions hipoosmòtiques, fins el $64.7 \pm 8.2\%$, com mostrava el WB (B).

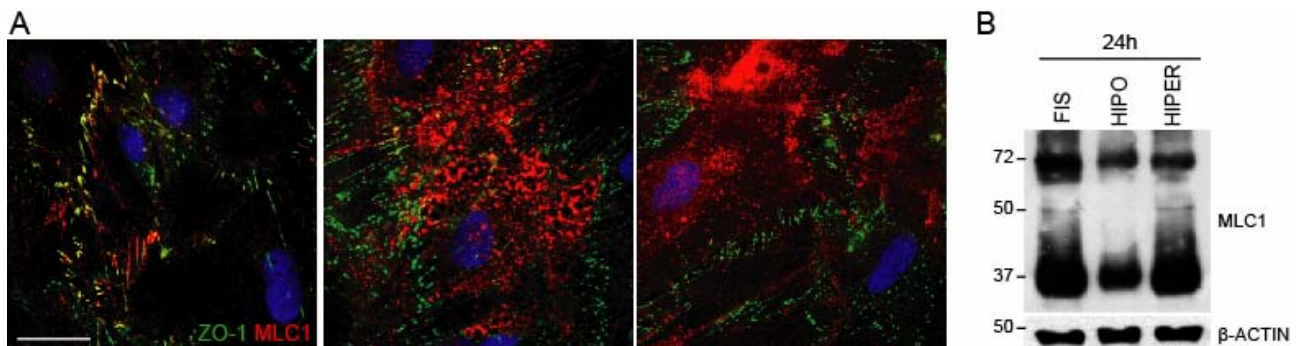


Figura 63. Canvi de localització de MLC1 en el model astrocitari en diferents condicions osmòtiques. Els astròcits es van tractar amb una solució fisiològica (300mOsm/kg), hipoosmòtica (180 mOsm/kg) i hiperosmòtica (500 mOsm/kg) durant 24h i es va analitzar la localització de MLC1 per IF i l'expressió per WB. (A) En condicions hipo i hiperosmòtiques, MLC1 (vermell) s'internalitza envoltant vacuoles citoplasmàtiques, mentre que ZO-1 (verd) no canvia la seva localització. Barra, 20µm. (B) WB dels astròcits tractats 24h amb les solucions fisiològica, hipoosmòtica i hiperosmòtica, on es pot veure una reducció dels nivells de MLC1 en la condició hipoosmòtica. L'actina s'usa com a control de càrrega.

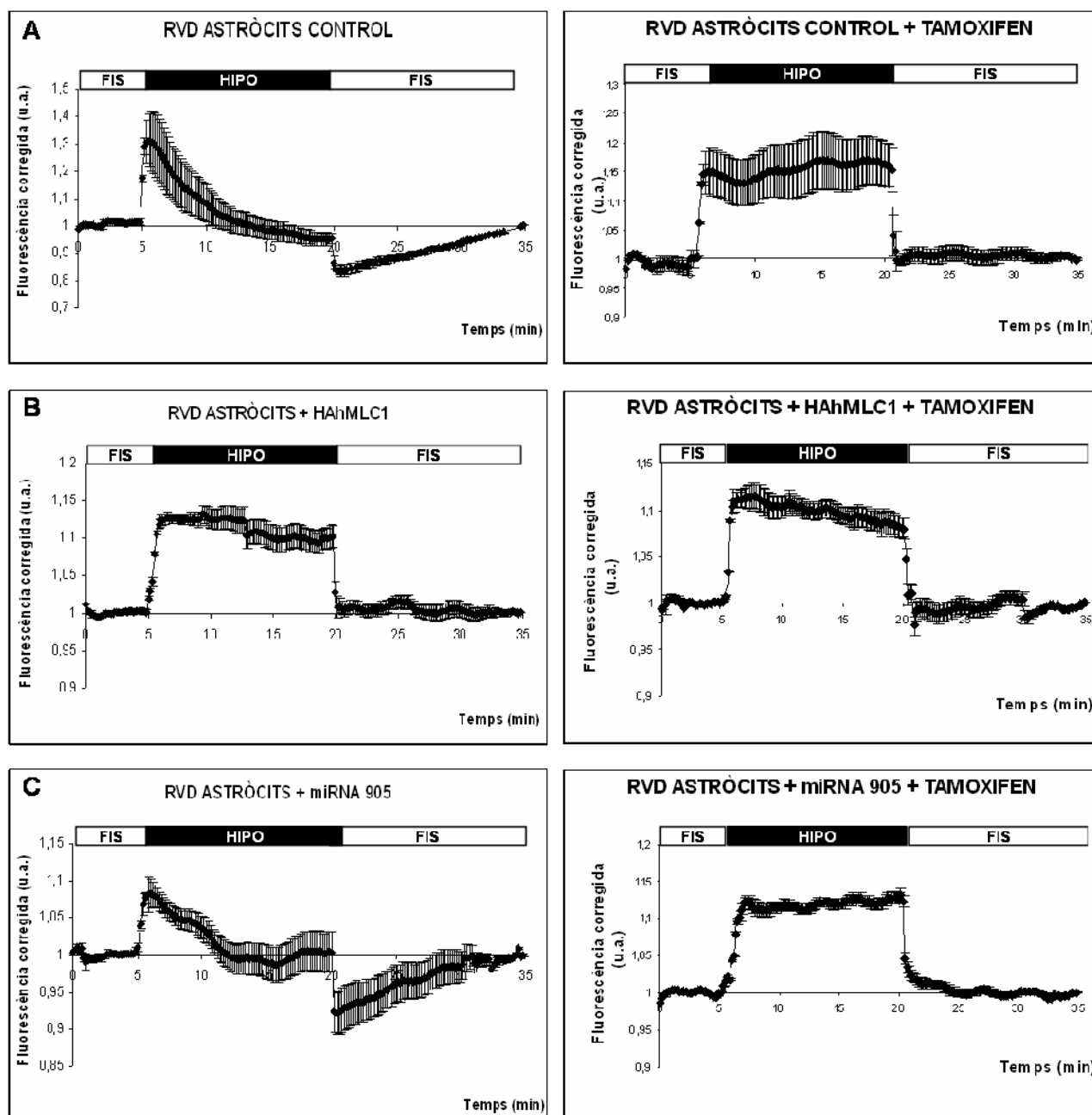
3. REGULACIÓ DEL VOLUM CEL·LULAR EN EL MODEL DE SOBREEXPRESSIÓ I *KNOCK-DOWN* DE MLC1

Vam voler estudiar si la funció de la proteïna MLC1 estava relacionada amb la regulació del volum cel·lular dels astròcits, concretament en el mecanisme de regulació RVD (*regulatory volume decrease*). Per tal d'estudiar aquest fenomen, es van fer servir dues tècniques: una tècnica d'imatge utilitzant la fluorescència per estudiar la recuperació del volum RVD; i una tècnica de sortida de D-Aspartat marcat amb radioactivitat (H^3), provocat pel RVD.

3.1. RVD per la tècnica d'imatge amb calceïna

La primera tècnica d'imatge que vam utilitzar per monitoritzar els canvis de volum i la recuperació d'aquest, va ser la calceïna. El model astrocitari va ser tractat amb una solució fisiològica (300 mOsm), una solució hipoosmòtica (180 mOsm) i una solució hiperosmòtica (500 mOsm), i es va sobreexpressar HAhMLC1 o inhibir MLC1 amb el miRNA 905. Per tal de no tenir interferències entre la calceïna i la GFP expressada juntament amb els miRNAs (ambdues s'excitaven a 488 nm), es van construir els AdVs miRNA SCR i 905 fusionats a la proteïna cherry (vermella). Per verificar que el fenomen que observàvem era degut al RVD, i per tant, a l'activació dels VRACs (*volume-regulated anion channels*), es va fer en paral·lel el mateix estudi però en presència d'un inhibidor dels VRACs, el tamoxifen (10 μ M), incorporat a les solucions osmòtiques.

Com es mostra en la gràfica 10 (A), els astròcits control presentaven una recuperació total del volum inicial i, en canvi, en presència de l'inhibidor de VRACs tamoxifen, les cèl·lules eren incapaces de recuperar el seu volum. Per contra, els astròcits que sobreexpressaven HAhMLC1 (B) presentaven una recuperació del volum mínima, que no canviava en presència de tamoxifen. L'efecte contrari l'observàvem en els astròcits sense MLC1 (miRNA 905, C), on la recuperació del volum era ràpida i s'inhibia amb tamoxifen.



Gràfica 10. Regulació del volum cel·lular del model astrocitari en condicions hipoosmòtiques (180 mOsm/kg) sense o amb inhibidor tamoxifen (10 μ M). (A) RVD en astròcits control, (B) en astròcits que sobreexpressen HAhMLC1 o en (C) astròcits amb el miRNA 905 deficients de MLC1.

Es van calcular diversos paràmetres (taula 4) per cada condició.

Paràmetre	Astròcits		
	Control	+ HAhMLC1	miRNA 905
Àrea cel·lular	3,72 \pm 0,25	5,22 \pm 0,28	3,02 \pm 0,15
Temps pel pic (min)	0,67 \pm 0,08	1,8 \pm 0,2	1,14 \pm 0,09
Pf (cm/seg)	0,006	0,652	0,038
RVD (%)	100	33,27 \pm 4,1	100
Temps RVD (min)	8,24 \pm 0,8	>15	6,56 \pm 0,3

Taula 4. Dades d'inflament dels astròcits i recuperació del volum en presència o absència de MLC1. L'àrea cel·lular està calculada amb l'ImageJ (unitats arbitràries). El temps pel pic és el temps necessari per arribar a la màxima fluorescència en el xoc hipoosmòtic. Pf, permeabilitat de l'aigua. RVD, % de recuperació del volum inicial, i el temps RVD és el temps que tarda a recuperar el volum inicial.

Les dades de permeabilitat (Pf) dels astròcits que sobreexpressaven HAhMLC1 era 107 vegades superior comparada a la dels astròcits control, mentre que els astròcits deficientes de MLC1 era de 6,17 vegades superior.

Quan ens vam fixar en les imatges corresponents a l'experiment anterior vam observar que, un cop els astròcits cultivats en monocapa estaven carregats amb la calceïna, la fluorescència no era homogènia, ja que era més intensa a l'àrea central corresponent al nucli. En condicions hipoosmòtiques, apareixien unes zones protuberants on la intensitat de fluorescència era més alta (figura 64, fletxes), sobretot en els astròcits on es sobreexpressava HAhMLC1, i apareixien majoritàriament en els contactes entre astròcits. En canvi, no apareixien en els astròcits deficitaris de MLC1.

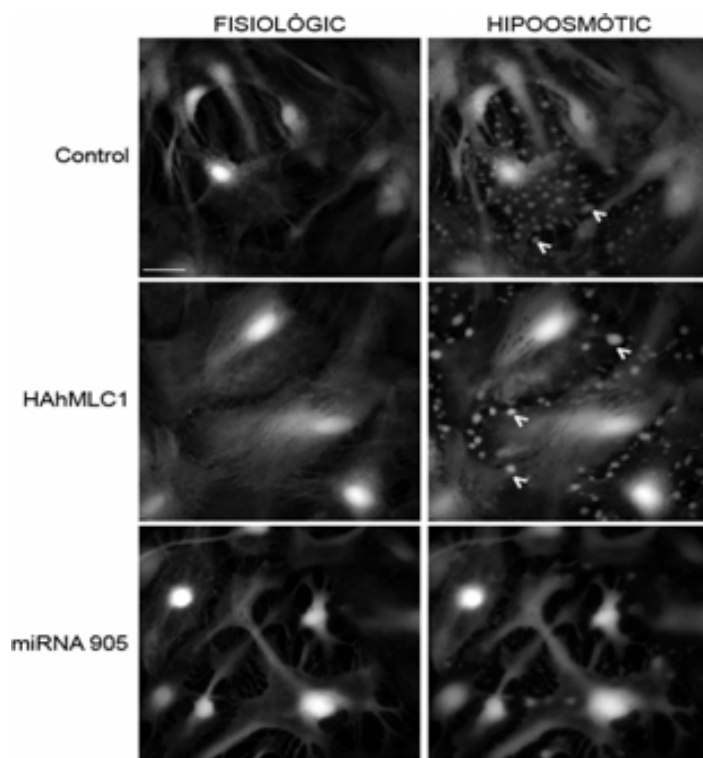


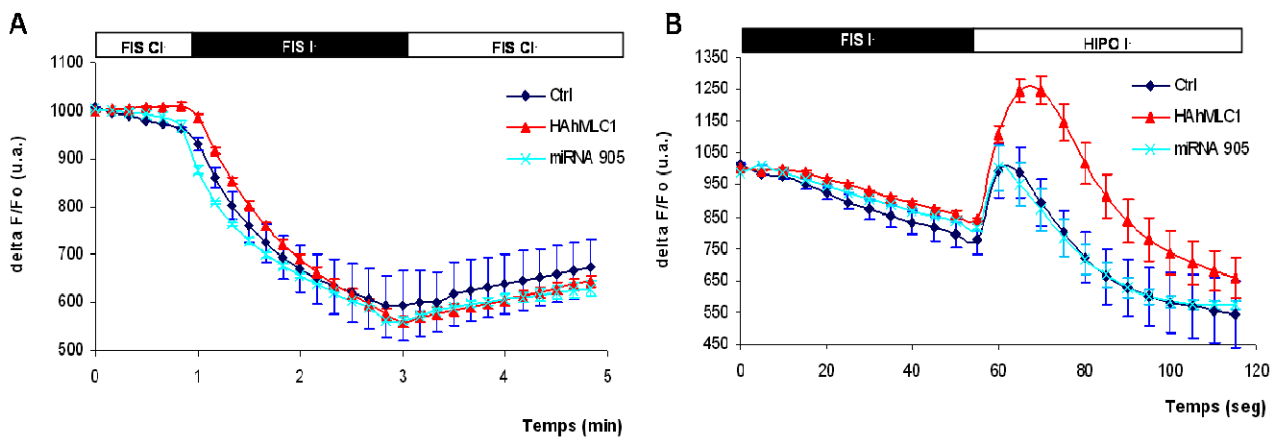
Figura 64. Imatges de fluorescència corresponents a la calceïna en els astròcits control, sobreexpressant MLC1 o deficientes en condicions fisiològiques i hipoosmòtiques. Es pot observar unes zones protuberants que apareixen en els astròcits HAhMLC1 en les unions (fletxes) que no apareixen en els astròcits miRNA 905. Barra, 20 μ m.

L'aparició d'aquestes protuberàncies just en les unions entre astròcits, on estava localitzada la proteïna MLC1, complementava la hipòtesi de que MLC1 produïa una entrada d'aigua superior i, per tant, un augment del volum que no observàvem en els astròcits els quals els hi mancava aquesta proteïna.

3.2. Transport de Cl^-/I^- detectat per canvis en la fluorescència intracel·lular de la proteïna YFP-H148Q/I152L

Una de les teories sobre la funció de MLC1 és que aquesta està relacionada amb les corrents de clorur. Com que no era possible utilitzar tècniques electrofisiològiques, es va utilitzar una tècnica d'imatge de bescanvi de Clorur/Iodur (Cl^-/I^-) mitjançant una proteïna fluorescent YFP-H148Q/I152L que s'expressa al citoplasma.

El model astrocítari es va transfectar amb el plàsmid que codifica per la proteïna YFP-H148Q/I152L i es va infectar amb els AdVs HAhMLC1 i miRNA 905 cherry. Com a control es van emprar els astròcits sense infectar. Això es va fer per comprovar si els astròcits que sobreexpressaven MLC1 o que els hi mancava, tenien una resposta diferent al canvi del Cl⁻ pel I⁻ en condicions fisiològiques (gràfica 11, A). La gràfica no mostrava cap alteració en les corbes d'intensitat de fluorescència dels astròcits amb o sense MLC1, comparades amb les del control. El següent pas va ser observar si en condicions de xoc osmòtic, els astròcits amb o sense MLC1 responien diferent. Per això, les cèl·lules es van tractar amb solució fisiològica de I⁻ seguit de la solució hiposmòtica de I⁻, que provoca l'inflament dels astròcits per l'entrada d'aigua per difusió. En la gràfica 11 (B), s'observa que el canvi a solució hiposmòtica produïa un augment de la fluorescència del sensor YFP que era major quan es sobreexpressava HAhMLC1, degut a la major entrada d'aigua i la dilució de la concentració intracel·lular dels ions, fet que provocava una disminució de la concentració de I⁻ i un augment en la fluorescència. La permeabilitat de l'aigua (Pf) es va calcular a partir del temps necessari per arribar al màxim de fluorescència des de l'aplicació de la solució hiposmòtica (Yong and TongHui, 2007). Com en els resultats de la calceïna, vam obtenir uns valors de permeabilitat de l'aigua superiors quan als astròcits sobreexpressaven HAhMLC1. La Pf dels astròcits control era de $0,00336 \pm 0,00059$ cm/s, la Pf dels astròcits que expressaven HAhMLC1 era de $0,401 \pm 0,03$ cm/s ($111,1 \pm 1\%$ superior a la dels astròcits control), mentre que la dels astròcits mancats de MLC1, la Pf era de $0,026 \pm 0,0052$ cm/s ($7,2\%$ superior).



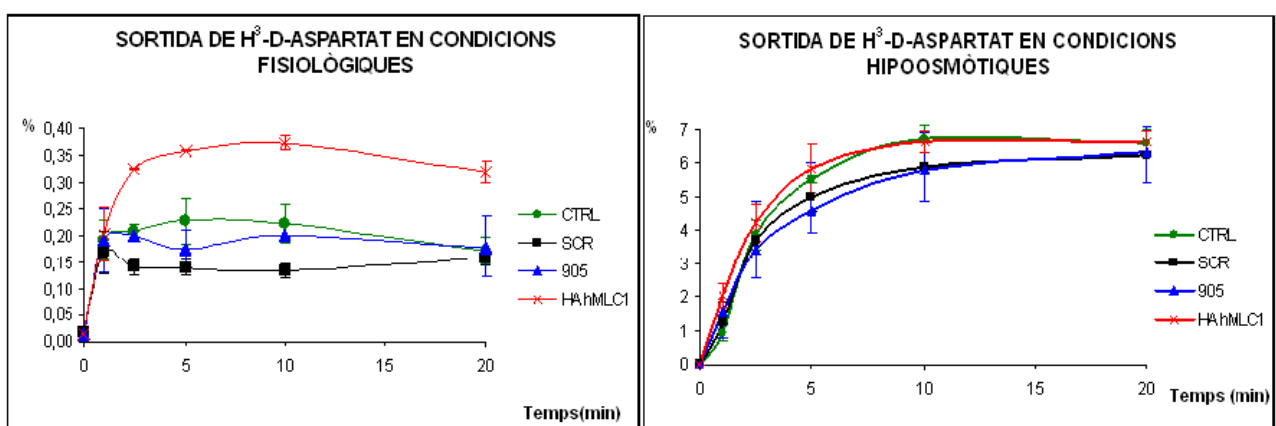
Gràfica 11. Perfils d'intensitat de fluorescència de la YFP-H148Q/I152L en els astròcits en diferents condicions d'osmolaritat i de composició iònica. (A) Corba on es mostra la disminució de la intensitat de fluorescència > 40% de la YFP-H148Q/I152L quan es canvia el Cl⁻ per I⁻ en condicions fisiològiques. La corba és similar en els astròcits control comparada amb els astròcits sobreexpressant o inhibint MLC1. (B) Corba d'intensitat de fluorescència en presència del I⁻ en condicions d'hiposmolaritat. Es pot veure que els astròcits que sobreexpressen HAhMLC1 tenen un increment en la resposta hiposmòtica, produint una major entrada d'aigua, comparat amb els astròcits control i deficients de MLC1.

3.3. RVD mesurant la sortida de [H³]-D-Aspartat

Està àmpliament descrit que durant l'inflament dels astròcits, tant en condicions fisiològiques com en estats patològics, aquests alliberen ions i osmòlits orgànics (glutamat, taurina i aspartat, entre

d'altres), com a part del procés de recuperació del volum RVD (Kimelberg et al., 1990; Pasantes-Morales et al., 1990; Mulligan and MacVicar, 2006).

En la gràfica 12 (esquerra), es mostren els perfils de sortida d'aspartat en condicions fisiològiques. Es pot observar que tant els astròcits control com els astròcits que expressaven els miRNAs SCR i 905, tenien una sortida d'aspartat similar; mentre que els astròcits que sobreexpressaven MLC1, tenien uns nivells de sortida d'aspartat més alts en condicions fisiològiques. En condicions hipoosmòtiques (dreta) es pot observar que els astròcits presentaven una sortida d'aspartat similar, i que la presència de MLC1 semblava tenir una sortida més ràpida que en absència, però en totes les condicions s'acabaven tenint els mateixos nivells de sortida d'aspartat.



Gràfica 12. Perfils de la sortida de $[H^3]$ -D-Aspartat dels astròcits amb o sense MLC1 en condicions fisiològiques o hipoosmòtiques en el temps. Esquerra, sortida d'aspartat en condicions fisiològiques on el control, el miRNA SCR i 905 tenen nivells similars, mentre que els astròcits sobreexpressant HAhMLC1 tenien una sortida superior. Dreta, perfils de sortida d'aspartat dels astròcits en condicions hipoosmòtiques on s'observa que la presència o absència de MLC1 no varia la sortida. Experiments fets en col·laboració amb en Xavi Capdevila.

Les dades d'aspartat ens indicaven que la sobreexpressió de MLC1 provocava l'activació parcial dels VRACs en condicions isosmòtiques i la sortida d'aspartat, fet que corroborava que un augment de l'expressió de la proteïna, provocava l'entrada d'aigua als astròcits (de manera directa o indirecte), produint l'inflament d'aquest i l'activació dels VRACs per recuperar el volum inicial.

4. GENS ALTERATS EN EL MODEL ASTROCITARI *KNOCK-DOWN*

L'estratègia que vam utilitzar per intentar trobar quins gens estaven alterats en el model astrocitari *knock-down*, per obtenir informació sobre les vies alterades en absència de MLC1, va ser l'ús dels *microarrays*. Aquest estudi es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Miguel López de Heredia (IDIBELL). Volíem obtenir dades que ens donessin informació sobre quins gens es sobreexpressaven en absència de MLC1, per tal d'obtenir els mecanismes compensatoris que desenvolupaven els astròcits per suplir la manca de la proteïna. L'abordatge experimental que es va seguir va ser extreure el RNA missatger dels astròcits infectats amb el miRNA SCR, 905 i 756, per comparar quins gens estaven alterats en absència de MLC1. L'error que vam cometre va ser

no incloure el control d'astròcits sense infectar, per comparar l'efecte del miRNA SCR, el qual, com vam comprovar posteriorment, induïa l'expressió de gens implicats en varies vies degut a l'acumulació de RNA de doble cadena.

4.1. Dades del *microarray*

L'anàlisi de les dades procedents d'un *microarray* és complicat i lent, i l'estudi de cada gen d'interès implica molta feina. En aquest apartat s'ha fet un resum d'alguns gens, els quals podrien ser interessants d'estudiar en relació a MLC1, encara que són dades molt preliminars. Les dades obtingudes es van comparar entre elles, utilitzant diagrames de Venn (<http://bioinfoq.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), per tal d'obtenir aquells gens sobreexpressats o reprimits comuns en ambdós miRNAs 756 i 905, i exclosos del miRNA SCR. Com a límit, es va triar un *Log2-fold change* superior a 1/-1 i es van eliminar aquells gen implicats en les vies alterades per dsRNA. La taula 5 resumeix algun dels gens més interessant sobreexpressats (taula superior) o reprimits (taula inferior).

p-Value	log2-FC	Gene Symbol	Gene Name
1,47E-05	2,16294	NM_012673	Rattus norvegicus Thy-1 cell surface antigen (Thy1), mRNA.
2,94E-06	1,86554	NM_012544	Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 (Ace), mRNA.
3,09E-07	1,86404	NM_138519	Rattus norvegicus dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3), mRNA.
2,45E-09	1,60100	NM_133569	Rattus norvegicus angiopoietin-like 2 (Angptl2), mRNA.
1,13E-06	1,57563	NM_031798	Rattus norvegicus solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2 (Slc12a2), mRNA.
7,64E-06	1,35004	NM_053719	Rattus norvegicus embigin (Emb), mRNA.
2,03E-07	1,34396	ENSRNOT00000024128	similar to secreted frizzled-related sequence protein 1 gene:ENSRNOG00000017783
5,04E-06	1,26400	NM_031646	Rattus norvegicus receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2 (Ramp2), mRNA.
2,70E-05	1,25146	ENSRNOT00000048543	SEZ6b gene:ENSRNOG00000009350
9,06E-06	1,24911	NM_001007672	Rattus norvegicus transmembrane protein 98 (Tmem98), mRNA.
4,81E-08	1,23611	NM_019204	Rattus norvegicus beta-site APP cleaving enzyme 1 (Bace1), mRNA.

p-Value	log2-FC	Gene Symbol	Gene Name
1,27E-08	-2,6200	NM_133315	Rattus norvegicus solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1 (Slc40a1), mRNA.
4,87E-06	-2,2631	NM_001108321	Rattus norvegicus receptor transporter protein 4 (Rtp4), mRNA.
7,78E-07	-2,2260	NM_001108105	Rattus norvegicus megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human) (Mlc1), mRNA.
7,89E-04	-1,8688	NM_001106057	Rattus norvegicus SLIT and NTRK-like family, member 6 (Slitrk6), mRNA.
2,83E-05	-1,6021	NM_053453	Rattus norvegicus regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2), mRNA.
1,38E-06	-1,5165	NM_017217	Rattus norvegicus solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3 (Slc7a3), mRNA.
1,66E-04	-1,4777	NM_017029	Rattus norvegicus neurofilament, medium polypeptide (Nefm), mRNA.
7,33E-08	-1,4001	NM_031831	Rattus norvegicus reticulon 4 (Rtn4), mRNA.
7,62E-06	-1,3501	NM_001008555	Rattus norvegicus solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4 (Slc10a4), mRNA.
1,01E-05	-1,3272	NM_021766	Rattus norvegicus progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1), mRNA.
5,07E-07	-1,1960	NM_053818	Rattus norvegicus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (Slc6a9), mRNA.
4,64E-05	-1,1475	NM_001113357	Rattus norvegicus neuropeptide Y receptor Y1 (Npy1r), mRNA.
9,98E-06	-1,0781	NM_053926	Rattus norvegicus phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha (Pip4k2a), mRNA.
3,21E-07	-1,0762	ENSRNOT00000029453	similar to plectin 1 gene:ENSRNOG00000024250
1,50E-03	-1,0273	NM_013119	Rattus norvegicus sodium channel, voltage-gated, type III, alpha (Scn3a), mRNA.

Taula 5. *Microarrays* del model *knock-down* de MLC1. Superior, resum d'alguns gens sobreexpressats en absència de MLC1 en astròcits amb un $\log_2 > 1$. Inferior, gens reprimits en astròcits deficients de MLC1 amb un $\log_2 < -1$, on es pot veure MLC1 amb un $\log_2 = -2,226$.

Els gens seleccionats estaven implicats en varies vies, com per exemple en el desenvolupament neuronal i en la diferenciació (*Thy1*, *SEZ6*, *Slitrk6*, *Slc7a3*, *Nefm*, *Rtn4*, *Slc10a4*, *BACE1*), en la via de la GPCR (*Npy1r*, *Rgs2*) implicada en el volum (*Ace*), en la via de Wnt (*Dkk3* i *frizzled*), i diversos canals i transportadors (*Slc12a2* (NKCC1), *Tmem98*, *Slc40a1*, *Slc7a3* (CAT3), *Slc10a4*, *Slc6a9* (GLYT-1), *Pip4k2a* i *Scn3a* (Nav1.3)). Actualment, s'està estudiant el cotransportador NKCC1 (*Slc12a2*), el qual està implicat en la regulació del volum RVI en els astròcits (Jayakumar et al., 2008).

5. DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts ens demostraven que el marcatge detectat per l'anticòs contra MLC1 era específic de la proteïna, ja que aquest desapareixia en absència de MLC1. La manca de proteïna MLC1 provoca alteracions morfològiques en els astròcits en el nostre model. Gràcies al model de complementació, podem dir que els canvis observats, de vacuolització i disminució de la mida cel·lular, eren específics de la manca de MLC1, ja que vam observar la recuperació del fenotip cel·lular quan vam sobreexpressar HAhMLC1. Uns resultats similars estan descrits en el model *knock-down* d'AQP4, on també observaven canvis en la morfologia dels astròcits, cap a un fenotip estrellat i una reducció de la mida cel·lular (Nicchia et al., 2003). En aquest estudi, també van observar que la disminució de l'expressió de l'AQP4 produïa una disminució en l'expressió de les proteïnes Cx43, CIC-2 i Kir4.1 (Benfenati et al., 2007). Les nostres observacions en el model astrocitari *knock-down* de MLC1 no mostren cap canvi en els nivells d'expressió d'aquestes tres proteïnes.

Els resultats són prometedors, ja que la malaltia està considerada com una leucodistrofia vacuolitzant i els pacient presenten vacuoles a la làmina exterior de la mielina, per això vam hipotetitzar que MLC1 podria estar implicat en el volum cel·lular. Està descrit que l'expressió d'altres proteïnes també es veu afectada per l'inflament dels astròcits, com la disminució de la GFAP en l'inflament produït per amoni (Belanger et al., 2002; Neary et al., 1994), l'augment de l'AQP4 en aquestes condicions (Rama Rao et al., 2003), o l'augment de NKCC1 (Jayakumar et al., 2008). La naturalesa de les vacuoles intracel·lulars encara no està definida, però vam suposar que eren vacuoles d'aigua i que la seva funció seria d'emmagatzematge i de reserva. Hem pogut observar que al canviar el medi extracel·lular dels astròcits amb vacuoles (deficients de MLC1) per un medi hiperosmòtic, aquestes desapareixen. Està descrit en organismes unicel·lulars eucariotes, com en Protozous (Allen and Naitoh, 2002; Nishihara et al., 2008; Rohloff and Docampo, 2008), un sistema d'osmoregulació per vacuoles contràctils, les quals emmagatzemen l'aigua i l'utilitzen per equilibrar l'homeostasi iònica. En astròcits també està descrit que tenen un sistema d'aparells vacuolars (Lindo et al., 1993), i que determinats agents organofosfòrics causen vacuolització, en la qual es veu implicada la via de senyalització d'ERK (Isobe et al., 2003). Per tal d'aclarir la

naturalesa d'aquestes vacuoles, fan falta més estudis, com ara la determinar la composició del medi intra-vacuolar, si són mitocondries inflades, o si estan envoltades de membrana.

Les dades de calceina i del sensor YFP-H148Q/I152L, ens indiquen que la sobreexpressió de MLC1 produeix un augment significatiu de la permeabilitat astrocitària de l'aigua en condicions d'hiposmolaritat, fet que ens faria pensar que MLC1 podria funcionar com un canal d'aigua, semblant a una aquaporina. Està descrit que el *knock-down* d'AQP4 produeix una disminució de l'activitat dels VRACs en els astròcits (Benfenati and Ferroni, 2009). Però les dades són contradictòries, ja que seguint aquesta hipòtesi, la manca de MLC1 hauria de provocar una disminució en la permeabilitat de l'aigua, com està descrit en el model de ratolí KO d'AQP4 (Solenov et al., 2004). Aquest fet es podria explicar si la manca de MLC1 i l'engorgiment de la mida cel·lular produís l'activació del RVI en els astròcits. El mecanisme de recuperació de volum RVI consisteix en l'activació dels canals i transportadors d'entrada d'ions, com el cotransportador NKCC1, per introduir aigua a les cèl·lules. Això explicaria que els astròcits sense MLC1 tinguin una entrada d'aigua superior al control, quan s'esperaria que tinguessin una menor permeabilitat. Aquest raonament està recolzat per les dades del *microarray*, on hem vist un augment en l'expressió del gen *Slc12a2* (NKCC1).

Les dades de sortida d'aspartat també donen suport a la hipòtesi que MLC1 funcionaria com un canal d'entrada d'aigua. La sobreexpressió de MLC1 produiria una major entrada d'aigua dins dels astròcits i el seu inflament. Aquest inflament activaria el mecanisme de RVD per recuperar el volum inicial, fent sortir els osmòlits orgànics (aspartat) de la cèl·lula, acompanyats d'aigua.

La baixa homologia de MLC1 amb el canal kv1.1, i la seva repressió en els ratolins KO de *Kv1.1* i *RFX4_V3*, que presenten hidrocefàlia, suporta la hipòtesi que MLC1 podria funcionar com un transportador o canal d'aigua o d'algun ió.

Un dels problemes que vam tenir en el disseny del *microarray* de MLC1 és que vam fer servir, de control, els astròcits infectats amb el AdV miRNA SCR per comparar l'efecte dels miRNAs 756 i 905, però no vam incorporar un control d'astròcits sense infectar. En comprovar alguns dels gens per RT-PCR en mostres control d'astròcits sense infectar, ens vam adonar que el miRNA SCR, per si sol, induïa l'expressió de molts gens (Geiss et al., 2001; Persengiev et al., 2004). Per aquest motiu, els gens alterats en el *microarray* s'han de comprovar per RT-PCR. Aquesta anàlisi s'està portant a terme en l'actualitat. Gràcies a ella hem comprovat que molts dels gens reprimits eren falsos positius, ja que el miRNA SCR provocava la sobreexpressió dels mateixos.

DISCUSSIÓ GENERAL I HIPÒTESI

DISCUSSIÓ GENERAL

Aquest treball aporta informació que ens ha permès avançar i ampliar els coneixements actuals de la malaltia Leucoencefalopatia Megalencefàlica a diferents nivells.

Les eines generades per estudiar la proteïna humana MLC1 ens han permès fer una caracterització inicial en humans, demostrant que MLC1 s'expressa majoritàriament al SN, en els astròcits i en les neurones, i també en monòcits de sang perifèrica. La detecció de MLC1 als monòcits ha aportat una nova eina de diagnòstic, que pot complementar la ressonància magnètica d'imatge utilitzada actualment per diagnosticar als pacients, tenint en compte que l'obtenció de biòpsies cerebrals dels individus afectats és molt difícil. L'estudi d'algunes mutacions descrites en el gen *MLC1*, ha revelat que provoquen un defecte en el plegament de la proteïna, el qual es tradueix en l'absència d'aquesta en els pacients amb MLC, un defecte comú en totes les mutacions estudiades.

El model astrocitari i neuronal ens ha aportat un nou sistema per estudiar la proteïna a nivell bioquímic. La localització de MLC1 a unions astrocitàries i la interacció amb GlialCAM, ens ha ampliat el coneixement de l'interactoma de MLC1, fet que facilitarà la comprensió del possible mecanisme que causa la malaltia. La localització de MLC1 en neurones i la detecció de la proteïna en aquest tipus cel·lular durant el desenvolupament, o en lesions cerebrals, obre un nou camp d'estudi, ja que suggereix que MLC1 podria tenir funcions diferents depenent del tipus cel·lular, del seu estadi de desenvolupament i del procés de mielinització.

El millor sistema per entendre la fisiopatologia de la malaltia és el model de ratolí KO. Amb el seu estudi s'avançarà molt més ràpid en el coneixement de MLC. Com que durant el transcurs d'aquest treball no ha estat possible treballar amb el model de ratolí, s'ha generat el model astrocitari *knock-down*, el qual ens ha revelat alguns canvis morfològics en els astròcits causats per l'absència de la proteïna MLC1. Aquest model ha permès observar canvis cel·lulars, els quals inclouen una reducció de la mida i l'aparició de vacuoles citoplasmàtica, específics de la manca de la proteïna. Hem observat que aquests canvis poden estar relacionats amb el volum cel·lular i la seva regulació. S'han pogut aplicar tècniques d'imatge en el model astrocitari per observar els canvis en la permeabilitat de l'aigua i en la regulació del volum en astròcits, les quals han aportat informació sobre la possible funció de canal que pot tenir MLC1. Per determinar aquest darrer aspecte, però, fan falta més estudis que defineixin el mecanisme funcional de la proteïna, i les vies que s'alteren degut a la seva absència.

HIPÒTESI

MLC és una leucodistròfia vacuolitzant que es caracteritza per macrocefàlia, la substància blanca difusa i vacuoles a la làmina exterior de la mielina. Els resultats presentats en aquest treball permeten relacionar la proteïna MLC1 amb el volum cel·lular o amb la seva regulació en astròcits, dades que suporten que MLC1 podria estar funcionant com un canal/transportador. Les vacuoles observades a la mielina dels pacients afectats per la malaltia, suggereixen que MLC1 podria tenir un paper en l'osmoregulació i en l'equilibri iònic.

D'acord amb això, les nostres hipòtesis sobre la funció de MLC1 en astròcits són 3 (figura 65):

- 1- La proteïna MLC1 tindria una funció de canal d'entrada d'aigua, o d'un canal similar a unions *gap*, que contribuïssin a la comunicació entre astròcits i en el transport d'aigua i soluts per la xarxa astrocitària.
- 2- La proteïna MLC1 funcionaria com un transportador d'entrada de Cl⁻ o de K⁺, amb la conseqüent entrada d'aigua.
- 3- La proteïna MLC1 funcionaria com un VRACs.

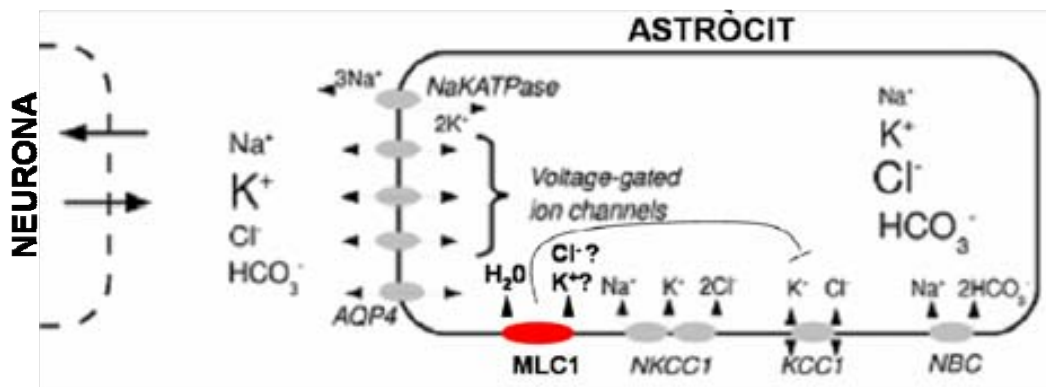


Figura 65. Esquema del paper dels astròcits en el control iònic de l'espai extracel·lular al voltant de les sinapsis neuronals. En ell es mostren els diferents canals i transportadors implicats en la regulació del volum, i els ions que hi intervenen. Les hipòtesis sobre les possibles funcions de MLC1, es representen en vermell (imatge modificada d'Ostby et al., 2009).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Conclusions de l'objectiu 1:

- Degut a la complexitat del procés d'obtenció del ratolí KO condicional de MLC1, es va comptar amb els serveis d'una empresa externa especialitzada. Actualment, s'ha aconseguit el ratolí KO total de MLC1 i s'estan realitzant els primers estudis per a la seva caracterització.

Conclusions de l'objectiu 2:

- Els anticossos generats contra la proteïna MLC1 humana ens han servit per estudiar i caracteritzar MLC1 en mostres humanes. Gràcies a aquests estudis s'ha vist que la proteïna humana està expressada majoritàriament a sistema nerviós, concretament en astròcits perivasculars i en neurones. En condicions patològiques d'infart cerebral, hi ha un augment de l'expressió de MLC1 en la zona de penombra corresponent a axons desmielinitzats, i no a astròcits reactius.
- Les mutacions de MLC1, descrites en pacients, causen un defecte en el plegament de la proteïna que provoca una retenció intracel·lular d'aquesta, impossibilitant la seva arribada a membrana.
- L'expressió de MLC1 en monòcits de sang perifèrica ofereix una nova eina de diagnòstic pels pacients afectats amb MLC. L'estudi de diverses mutacions de MLC1, en els monòcits procedents dels pacients, ha revelat que causen una manca total de l'expressió de la proteïna, fenomen comú en totes les mutacions estudiades.

Conclusions de l'objectiu 3:

- S'han descrit dos models cel·lulars que ens han permès estudiar la bioquímica i biologia cel·lular de la proteïna MLC1. En el model cel·lular primari d'astròcits de rata, la proteïna MLC1 està localitzada en unions complexes entre astròcits, interaccionant amb ZO-1 i GlialCAM, i la seva localització depèn del citoesquelet d'actina. En canvi, MLC1 no forma part del complex Distrofina-Glicoproteïna.
- La manca de la proteïna MLC1 produeix canvis en la morfologia cel·lular, la disminució de la mida i l'aparició de vacuoles citoplasmàtiques en el model astrocitari. Aquests canvis són específics de la proteïna MLC1, ja que es reverteixen quan es torna a expressar el missatger en els astròcits deficient de MLC1. La sobreexpressió de MLC1 també provoca canvis en la mida dels astròcits, fent que aquests siguin més grans.
- L'expressió i la localització de la proteïna MLC1 estan alterades pels canvis en el volum cel·lular. La sobreexpressió de MLC1 en el model astrocitari provoca un augment en la permeabilitat de l'aigua i l'activació dels VRACs produint la sortida d'osmòlits orgànics en condicions isosmòtiques.
- En el model primari de neurones de rata, MLC1 té una localització axonal en forma de filament, el qual difereix de la seva localització en astròcits.

BIBLIOGRAFIA

Reference List

- Abbott, N. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 527.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41-53.
- Adermark, L., Olsson, T., and Hansson, E. (2004). Ethanol acutely decreases astroglial gap junction permeability in primary cultures from defined brain regions. *Neurochem. Int.* 45, 971-978.
- Ahlemeyer, B., and Baumgart-Vogt, E. (2005). Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J. Neurosci. Methods* 149, 110-120.
- Alberts, 2002. Desmosomes connect intermediate filaments from cell to cell, *molecular biology of de cell.*
- Allen, R.D., and Naitoh, Y. (2002). Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. *Int. Rev. Cytol.* 215, 351-394.
- Almgren, M., Nyengaard, J.R., Persson, B., and Lavebratt, C. (2008). Carbamazepine protects against neuronal hyperplasia and abnormal gene expression in the megalencephaly mouse. *Neurobiol. Dis.* 32, 364-376.
- Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T.C., and Aloisi, F. (2008). Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 480-493.
- Angrand, P.O., Daigle, N., van der Hoeven, F., Scholer, H.R., and Stewart, A.F. (1999). Simplified generation of targeting constructs using ET recombination. *Nucleic Acids Res.* 27, e16.
- Argaw, A.T., Zhang, Y., Snyder, B.J., Zhao, M.L., Kopp, N., Lee, S.C., Raine, C.S., Brosnan, C.F., and John, G.R. (2006). IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J. Immunol.* 177, 5574-5584.
- Baorto, D.M., Mellado, W., and Shelanski, M.L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J. Cell Biol.* 117, 357-367.
- Barbe, M.T., Monyer, H., and Bruzzone, R. (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21, 103-114.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T.M., Danninger, C., Probst, G., and Krizbai, I.A. (1999). Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp. Cell Res.* 250, 434-438.
- Belanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., and Butterworth, R.F. (2002). Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem. Int.* 41, 155-160.
- Benarroch, E.E. (2005). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc.* 80, 1326-1338.
- Benfenati, V., and Ferroni, S. (2009). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience*
- Benfenati, V., Nicchia, G.P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A., and Ferroni, S. (2007). Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 100, 87-104.
- Ben-Zeev, B., Levy-Nissenbaum, E., Lahat, H., Anikster, Y., Shinar, Y., Brand, N., Gross-Tzur, V., MacGregor, D., Sidi, R., Kleta, R., Frydman, M., and Pras, E. (2002). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews. *Hum. Genet.* 111, 214-218.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.

- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L., and Graham, F.L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8802-8806.
- Bettecken, T., Rubie, C., Lichtner, P., Siekiera, M., Meitinger, T., and Stober, G. (2002). Reduced amplification efficiency of KIAA0027/MLC1 alleles: implications for the molecular diagnosis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Mol. Cell. Probes* 16, 379-384.
- Biancheri, R., Pisaturo, C., Perrone, M.V., Pessagno, A., Rossi, A., and Veneselli, E. (2000). Presence of delayed myelination and macrocephaly in the sister of a patient with vacuolating leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Neuropediatrics* 31, 321-324.
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P.N., and Shaw, P.J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 57, 1251-1264.
- Blake, D.J. (2002). Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul. Disord.* 12 Suppl 1, S110-7.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S., and Kohler, W. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics* 34, 215-218.
- Boda-Heggemann, J., Regnier-Vigouroux, A., and Franke, W.W. (2009). Beyond vessels: occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE)-cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 335, 49-65.
- Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J.C., van Horsen, J., Dinopoulos, A., Bove, K.E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F., *et al.* (2007). MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.* 114, 403-410.
- Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C., and van der Knaap, M.S. (2005). MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 412-419.
- Bouvier, J., and Cheng, J.G. (2009). Recombineering-based procedure for creating Cre/loxP conditional knockouts in the mouse. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 23, Unit 23.13.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brembeck, F.H., Rosario, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51-59.
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E.A., and Hopkins, A.M. (2010). Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 460607.
- Brockmann, K., Finsterbusch, J., Terwey, B., Frahm, J., and Hanefeld, F. (2003). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in an adult: quantitative proton MR spectroscopy and diffusion tensor MRI. *Neuroradiology* 45, 137-142.
- Bruzzo, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13644-13649.
- Bugiani, M., Moroni, I., Bizzi, A., Nardocci, N., Bettecken, T., Gartner, J., and Uziel, G. (2003). Consciousness disturbances in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Neuropediatrics* 34, 211-214.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., and Barres, B.A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28, 264-278.

- Campbell, I.D. (2008). Studies of focal adhesion assembly. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 263-266.
- Chanson, M., Kotsias, B.A., Peracchia, C., and O'Grady, S.M. (2007). Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 233-244.
- Cho, W., and Messing, A. (2009). Properties of astrocytes cultured from GFAP over-expressing and GFAP mutant mice. *Exp. Cell Res.* 315, 1260-1272.
- Chung Moh, M., Hoon Lee, L., and Shen, S. (2005). Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 42, 833-841.
- Chvatal, A., Anderova, M., and Kirchhoff, F. (2007). Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J. Anat.* 210, 671-683.
- Comes, N., Abad, E., Morales, M., Borrás, T., Gual, A., and Gasull, X. (2006). Identification and functional characterization of CIC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res.* 83, 877-889.
- Crowe, W.E., Altamirano, J., Huerto, L., and Alvarez-Leefmans, F.J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* 69, 283-296.
- De Stefano, N., Balestri, P., Dotti, M.T., Grosso, S., Mortilla, M., Morgese, G., and Federico, A. (2001). Severe metabolic abnormalities in the white matter of patients with vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. A proton MR spectroscopic imaging study. *J. Neurol.* 248, 403-409.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6, 204.
- Derouiche, A., and Frotscher, M. (2001). Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330-341.
- Derycke, L.D., and Bracke, M.E. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 463-476.
- Devaney, J.M., Donarum, E.A., Brown, K.M., Meyer, J., Stober, G., Lesch, K.P., Nestadt, G., Stephan, D.A., and Pulver, A.E. (2002). No missense mutation of WKL1 in a subgroup of probands with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7, 419-423.
- Dietrich, J., Lacagnina, M., Gass, D., Richfield, E., Mayer-Proschel, M., Noble, M., Torres, C., and Proschel, C. (2005). EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat. Med.* 11, 277-283.
- Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A., *et al.* (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3728-3739.
- Duffy, H.S., John, G.R., Lee, S.C., Brosnan, C.F., and Spray, D.C. (2000). Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 20, RC114.
- Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., and McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* 4, 32.
- el-Fouly, M.H., Trosko, J.E., and Chang, C.C. (1987). Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.* 168, 422-430.
- Elter, A., Hartel, A., Sieben, C., Hertel, B., Fischer-Schliebs, E., Luttge, U., Moroni, A., and Thiel, G. (2007). A plant homolog of animal chloride intracellular channels (CLICs) generates an ion conductance in heterologous systems. *J. Biol. Chem.* 282, 8786-8792.
- Evans, W.H., and Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 606-612.
- Ewald, H., and Lundorf, M.D. (2002). The missense mutation in the WKL1 gene not found in patients with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 340-341.

- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B., and Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* 56, 633-645.
- Fiala, M., Liu, Q.N., Sayre, J., Pop, V., Brahmandam, V., Graves, M.C., and Vinters, H.V. (2002). Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 360-371.
- Fields, R.D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 31, 361-370.
- Fischer, S., Wobben, M., Marti, H.H., Renz, D., and Schaper, W. (2002). Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.* 63, 70-80.
- Ford, P., Rivarola, V., Chara, O., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Farman, N., Parisi, M., and Capurro, C. (2005). Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biol. Cell.* 97, 687-697.
- Giaume, C., Marin, P., Cordier, J., Glowinski, J., and Premont, J. (1991). Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5577-5581.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 315-324.
- Gorospe, J.R., and Maletkovic, J. (2006). Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 113-122.
- Gorospe, J.R., Singhal, B.S., Kainu, T., Wu, F., Stephan, D., Trent, J., Hoffman, E.P., and Naidu, S. (2004). Indian Agarwal megalencephalic leukodystrophy with cysts is caused by a common MLC1 mutation. *Neurology* 62, 878-882.
- Goutieres, F., Bouloche, J., Bourgeois, M., and Aicardi, J. (1996). Leukoencephalopathy, megalencephaly, and mild clinical course. A recently individualized familial leukodystrophy. Report on five new cases. *J. Child Neurol.* 11, 439-444.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Guarante, L., Roberts, T.M., and Ptashne, M. (1992). A technique for expressing eukaryotic genes in bacteria. 1980. *Biotechnology* 24, 261-263.
- Gulati, S., Kabra, M., Gera, S., Ghosh, M., Menon, P.S., and Kalra, V. (2000). Infantile-onset leukoencephalopathy with discrepant mild clinical course. *Indian J. Pediatr.* 67, 769-773.
- Haenggi, T., and Fritschy, J.M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1614-1631.
- Hagemann, T.L., Connor, J.X., and Messing, A. (2006). Alexander disease-associated glial fibrillary acidic protein mutations in mice induce Rosenthal fiber formation and a white matter stress response. *J. Neurosci.* 26, 11162-11173.
- Hagemann, T.L., Gaeta, S.A., Smith, M.A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Messing, A. (2005). Gene expression analysis in mice with elevated glial fibrillary acidic protein and Rosenthal fibers reveals a stress response followed by glial activation and neuronal dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2443-2458.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27, 6473-6477.
- Hamann, S., Kiilgaard, J.F., Litman, T., Alvarez-Leefmans, F.J., Winther, B.R., Zeuthen, T. (2002). Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching. *Journal of fluorescence*, 12, 2, 139-145.
- Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387-1394.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 660-669.

- Hatton, G.I. (2002). Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv. Physiol. Educ.* 26, 225-237.
- Hermosilla, T., Munoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Munoz, N., Nham, S.U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F., and Leyton, L. (2008). Direct Thy-1/ α V β 3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1111-1120.
- Hofgaard, J.P., Mollerup, S., Holstein-Rathlou, N.H., and Nielsen, M.S. (2009). Quantification of gap junctional intercellular communication based on digital image analysis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R243-7.
- Ho-Pun-Cheung, A., Bascoul-Mollevis, C., Assenat, E., Boissiere-Michot, F., Bibeau, F., Cellier, D., Ychou, M., and Lopez-Crapez, E. (2009). Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. *BMC Mol. Biol.* 10, 31.
- Howarth, A.G., Hughes, M.R., and Stevenson, B.R. (1992). Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am. J. Physiol.* 262, C461-9.
- Hsiao, V.C., Tian, R., Long, H., Der Perng, M., Brenner, M., Quinlan, R.A., and Goldman, J.E. (2005). Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J. Cell. Sci.* 118, 2057-2065.
- Huang, X., Yang, H., Zhou, Y., Liu, J., Yin, B., Peng, X., Qiang, B., and Yuan, J. (2004). Overexpression of human reticulon 3 (hRTN3) in astrocytoma. *Clin. Neuropathol.* 23, 1-7.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347-360.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369-1376.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *J. Neurosci.* 29, 7092-7097.
- Isobe, I., Maeno, Y., Nagao, M., Iwasa, M., Koyama, H., Seko-Nakamura, Y., and Monma-Ohtaki, J. (2003). Cytoplasmic vacuolation in cultured rat astrocytes induced by an organophosphorus agent requires extracellular signal-regulated kinase activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193, 383-392.
- Jakovcovic, D., and Harder, D.R. (2007). Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. *Curr. Top. Dev. Biol.* 79, 75-97.
- Jayakumar, A.R., Liu, M., Moriyama, M., Ramakrishnan, R., Forbush, B., 3rd, Reddy, P.V., and Norenberg, M.D. (2008). Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J. Biol. Chem.* 283, 33874-33882.
- Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R.M., Remington, S.J., and Verkman, A.S. (2000). Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J. Biol. Chem.* 275, 6047-6050.
- Jorgensen, T.H., Borglum, A.D., Mors, O., Wang, A.G., Pinaud, M., Flint, T.J., Dahl, H.A., Vang, M., Kruse, T.A., and Ewald, H. (2002). Search for common haplotypes on chromosome 22q in patients with schizophrenia or bipolar disorder from the Faroe Islands. *Am. J. Med. Genet.* 114, 245-252.
- Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 125B, 31-37.
- Kahle, K.T., Simard, J.M., Staley, K.J., Nahed, B.V., Jones, P.S., and Sun, D. (2009). Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 24, 257-265.
- Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., and Iino, M. (2007). Regulation of neurite growth by spontaneous Ca²⁺ oscillations in astrocytes. *J. Neurosci.* 27, 8957-8966.
- Kavanagh, T.J., Martin, G.M., el-Fouly, M.H., Trosko, J.E., Chang, C.C., and Rabinovitch, P.S. (1987). Flow cytometry and scrape-loading/dye transfer as a rapid quantitative measure of intercellular communication in vitro. *Cancer Res.* 47, 6046-6051.
- Kielian, T. (2008). Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J. Neurochem.* 106, 1000-1016.

- Kim, J.H., Kim, J.H., Park, J.A., Lee, S.W., Kim, W.J., Yu, Y.S., and Kim, K.W. (2006). Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 339-345.
- Kimelberg, H.K. (2004a). Increased release of excitatory amino acids by the actions of ATP and peroxynitrite on volume-regulated anion channels (VRACs) in astrocytes. *Neurochem. Int.* 45, 511-519.
- Kimelberg, H.K. (2004b). Volume activated anion channel and astrocytic cellular edema in traumatic brain injury and stroke. *Adv. Exp. Med. Biol.* 559, 157-167.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., and Waniewski, R.A. (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10, 1583-1591.
- Kimelberg, H.K., Macvicar, B.A., and Sontheimer, H. (2006). Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54, 747-757.
- Kiriyama, T., Tanizawa, E., Hirano, M., Shinkai, T., Asai, H., Furiya, Y., and Ueno, S. (2007). SPECT revealed cortical dysfunction in a patient who had genetically definite megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 109, 526-530.
- Koeda, T., and Takeshita, K. (1998). Slowly progressive cystic leukoencephalopathy with megalencephaly in a Japanese boy. *Brain Dev.* 20, 245-249.
- Kowalczyk, A.P., Borgwardt, J.E., and Green, K.J. (1996). Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J. Invest. Dermatol.* 107, 293-300.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735-739.
- Lanciotti, A., Brignone, M.S., Camerini, S., Serafini, B., Macchia, G., Raggi, C., Molinari, P., Crescenzi, M., Musumeci, M., Sargiacomo, M., *et al.* (2010). MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: Role of caveolin-1 and phosphorylation. *Neurobiol. Dis.* 37, 581-595.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913-949.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.
- Lee, L.H., Moh, M.C., Zhang, T., and Shen, S. (2009). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells. *J. Cell. Biochem.* 107, 1129-1138.
- Lee, M., Lee, S.J., Choi, H.J., Jung, Y.W., Frokiaer, J., Nielsen, S., and Kwon, T.H. (2008). Regulation of AQP4 protein expression in rat brain astrocytes: role of P2X7 receptor activation. *Brain Res.* 1195, 1-11.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C., and van der Knaap, M.S. (2002). Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.* 110, 279-283.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., *et al.* (2001). Mutations of MLC1 (K1AA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 831-838.
- Lezama, R., Diaz-Tellez, A., Ramos-Mandujano, G., Oropeza, L., and Pasantes-Morales, H. (2005). Epidermal growth factor receptor is a common element in the signaling pathways activated by cell volume changes in isosmotic, hyposmotic or hyperosmotic conditions. *Neurochem. Res.* 30, 1589-1597.
- Li, W., Hertzberg, E.L., and Spray, D.C. (2005). Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia. *J. Biol. Chem.* 280, 7941-7948.

- Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607-615.
- Lindo, L., Iborra, F.J., Azorin, I., Guerri, C., and Renau-Piqueras, J. (1993). Analysis of the endocytic-lysosomal system (vacuolar apparatus) in astrocytes during proliferation and differentiation in primary culture. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 565-572.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.* 13, 476-484.
- Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J.R., and Alemany, R. (2006). Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther.* 13, 696-705.
- Mandell, K.J., and Parkos, C.A. (2005). The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 857-867.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R., and Aten, J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell. Sci.* 103 (Pt 3), 857-862.
- Mantz, J., Cordier, J., and Giaume, C. (1993). Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Anesthesiology* 78, 892-901.
- Maragakis, N.J., and Rothstein, J.D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 679-689.
- Margeta-Mitrovic, M. (2002). Assembly-dependent trafficking assays in the detection of receptor-receptor interactions. *Methods* 27, 311-317.
- Matthews, C.A., Shaw, J.E., Hooper, J.A., Young, I.G., Crouch, M.F., and Campbell, H.D. (2007). Expression and evolution of the mammalian brain gene *Ttyh1*. *J. Neurochem.* 100, 693-707.
- McCarthy, K.D., and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-902.
- McQuillin, A., Kalsi, G., Moorey, H., Lamb, G., Mayet, S., Quested, D., Baker, P., Curtis, D., and Gurling, H.M. (2002). A novel polymorphism in exon 11 of the *WKL1* gene, shows no association with schizophrenia. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 491-494.
- Medrano, S., and Steward, O. (2001). Differential mRNA localization in astroglial cells in culture. *J. Comp. Neurol.* 430, 56-71.
- Mejaski-Bosnjak, V., and Besenski, N. (1997). Megalencephalic leukoencephalopathy: a further case of a new neurodegenerative white matter disease. *Dev. Med. Child Neurol.* 39, 561-563.
- Mejaski-Bosnjak, V., Besenski, N., Brockmann, K., Pouwels, P.J., Frahm, J., and Hanefeld, F.A. (1997). Cystic leukoencephalopathy in a megalencephalic child: clinical and magnetic resonance imaging/magnetic resonance spectroscopy findings. *Pediatr. Neurol.* 16, 347-350.
- Merril, C.R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* 182, 477-488.
- Meyer, J., Huberth, A., Ortega, G., Syagailo, Y.V., Jatzke, S., Mossner, R., Strom, T.M., Ulzheimer-Teuber, I., Stober, G., Schmitt, A., and Lesch, K.P. (2001). A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol. Psychiatry* 6, 302-306.
- Mignot, C., Boespflug-Tanguy, O., Gelot, A., Dautigny, A., Pham-Dinh, D., and Rodriguez, D. (2004). Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 369-385.
- Mineo, J.F., Quintin-Roue, I., Lucas, B., Buburusan, V., and Besson, G. (2002). Glioblastomas: clinical study and search for prognostic factors. *Neurochirurgie* 48, 500-509.
- Mirnic, K., and Lewis, D.A. (2001). Genes and subtypes of schizophrenia. *Trends Mol. Med.* 7, 281-283.

- Mischel, P.S., Shai, R., Shi, T., Horvath, S., Lu, K.V., Choe, G., Seligson, D., Kremen, T.J., Palotie, A., Liau, L.M., Cloughesy, T.F., and Nelson, S.F. (2003). Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* 22, 2361-2373.
- Moh, M.C., Lee, L.H., Yang, X., and Shen, S. (2003). HEPN1, a novel gene that is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces apoptosis in HepG2 cells. *J. Hepatol.* 39, 580-586.
- Moh, M.C., Lee, L.H., Zhang, T., and Shen, S. (2009). Interaction of the immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 755-760.
- Moh, M.C., and Shen, S. (2009). The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration: a new paradox. *Cell. Adh Migr.* 3, 334-336.
- Moh, M.C., Tian, Q., Zhang, T., Lee, L.H., and Shen, S. (2009). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM modulates cell adhesion and motility through direct interaction with the actin cytoskeleton. *J. Cell. Physiol.* 219, 382-391.
- Moh, M.C., Zhang, C., Luo, C., Lee, L.H., and Shen, S. (2005). Structural and functional analyses of a novel ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 27366-27374.
- Moh, M.C., Zhang, T., Lee, L.H., and Shen, S. (2008). Expression of hepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2298-2305.
- Moukhles, H., and Carbonetto, S. (2001). Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J. Neurochem.* 78, 824-834.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2006). VRACs CARVe a path for novel mechanisms of communication in the CNS. *Sci. STKE* 2006, pe42.
- Murayama, K.S., Kametani, F., Saito, S., Kume, H., Akiyama, H., and Araki, W. (2006). Reticulons RTN3 and RTN4-B/C interact with BACE1 and inhibit its ability to produce amyloid beta-protein. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1237-1244.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., Testa, G., and Stewart, A.F. (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27, 1555-1557.
- Nagasawa, M., Kanzaki, M., Iino, Y., Morishita, Y., and Kojima, I. (2001). Identification of a novel chloride channel expressed in the endoplasmic reticulum, golgi apparatus, and nucleus. *J. Biol. Chem.* 276, 20413-20418.
- Nagelhus, E.A., Mathiesen, T.M., and Ottersen, O.P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905-913.
- Narayanan, K., and Warburton, P.E. (2003). DNA modification and functional delivery into human cells using *Escherichia coli* DH10B. *Nucleic Acids Res.* 31, e51.
- Neary, J.T., Whittemore, S.R., Zhu, Q., and Norenberg, M.D. (1994). Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J. Neurochem.* 63, 2021-2027.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Nguyen, N.M., Pulkkinen, L., Schlueter, J.A., Meneguzzi, G., Uitto, J., and Senior, R.M. (2006). Lung development in laminin gamma2 deficiency: abnormal tracheal hemidesmosomes with normal branching morphogenesis and epithelial differentiation. *Respir. Res.* 7, 28.
- Nicchia, G.P., Frigeri, A., Liuzzi, G.M., and Svelto, M. (2003). Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *FASEB J.* 17, 1508-1510.
- Nicchia, G.P., Rossi, A., Mola, M.G., Procino, G., Frigeri, A., and Svelto, M. (2008). Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes. *Glia* 56, 1755-1766.

- Nicchia, G.P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C.F., Frigeri, A., and Spray, D.C. (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* 19, 1674-1676.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondamatteo, F., Herken, R., Girolamo, F., Marzullo, A., Svelto, M., and Roncali, L. (2003). Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42, 235-251.
- Nishihara, E., Yokota, E., Tazaki, A., Orii, H., Katsuhara, M., Kataoka, K., Igarashi, H., Moriyama, Y., Shimmen, T., and Sonobe, S. (2008). Presence of aquaporin and V-ATPase on the contractile vacuole of *Amoeba proteus*. *Biol. Cell.* 100, 179-188.
- Noell, S., Fallier-Becker, P., Beyer, C., Kroger, S., Mack, A.F., and Wolburg, H. (2007). Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2109-2118.
- Nyatia, E., and Lang, D.M. (2007). Localisation and expression of a myelin associated neurite inhibitor, Nogo-A and its receptor Nogo-receptor by mammalian CNS cells. *Res. Vet. Sci.* 83, 287-301.
- Oberheim, N.A., Tian, G.F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., and Nedergaard, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J. Neurosci.* 28, 3264-3276.
- Okamura, K., Tanaka, H., Yagita, Y., Saeki, Y., Taguchi, A., Hiraoka, Y., Zeng, L.H., Colman, D.R., and Miki, N. (2004). Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *J. Cell Biol.* 167, 961-972.
- Opsahl, H., and Rivedal, E. (2000). Quantitative determination of gap junction intercellular communication by scrape loading and image analysis. *Cell Adhes. Commun.* 7, 367-375.
- Ostby, I., Oyehaug, L., Einevoll, G.T., Nagelhus, E.A., Plahte, E., Zeuthen, T., Lloyd, C.M., Ottersen, O.P., and Omholt, S.W. (2009). Astrocytic mechanisms explaining neural-activity-induced shrinkage of extraneuronal space. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000272.
- Otis, T.S., and Sofroniew, M.V. (2008). Glia get excited. *Nat. Neurosci.* 11, 379-380.
- Paciaroni, M., Caso, V., and Agnelli, G. (2009). The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur. Neurol.* 61, 321-330.
- Pan, Y.X., Wu, Y., Niu, Z.P., and Jiang, Y.W. (2009). Eukaryotic translation initiation factor 2B and leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Beijing Da Xue Xue Bao* 41, 608-610.
- Pasantes-Morales, H., Cardin, V., and Tuz, K. (2000a). Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem. Res.* 25, 1301-1314.
- Pasantes-Morales, H., Franco, R., Ochoa, L., and Ordaz, B. (2002). Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem. Res.* 27, 59-65.
- Pasantes-Morales, H., Franco, R., Torres-Marquez, M.E., Hernandez-Fonseca, K., and Ortega, A. (2000b). Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.* 10, 361-370.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R.A., and Ramos-Mandujano, G. (2006). Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol. (Oxf)* 187, 93-102.
- Pasantes-Morales, H., and Martin del Rio, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 351, 317-328.
- Pasantes-Morales, H., and Morales Mulia, S. (2000). Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86, 414-427.
- Pasantes-Morales, H., Moran, J., and Schousboe, A. (1990). Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3, 427-432.

- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A., *et al.* (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534-537.
- Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.
- Persson, A.S., Westman, E., Wang, F.H., Khan, F.H., Spenger, C., and Lavebratt, C. (2007). Kv1.1 null mice have enlarged hippocampus and ventral cortex. *BMC Neurosci.* 8, 10.
- Plumb, J., McQuaid, S., Mirakhur, M., and Kirk, J. (2002). Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 12, 154-169.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Pronk, J.C., van Kollenburg, B., Scheper, G.C., and van der Knaap, M.S. (2006). Vanishing white matter disease: a review with focus on its genetics. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 123-128.
- Qi, P., Han, J.X., Lu, Y.Q., Wang, C., and Bu, F.F. (2006). Virus-encoded microRNAs: future therapeutic targets? *Cell. Mol. Immunol.* 3, 411-419.
- Rama Rao, K.V., Chen, M., Simard, J.M., and Norenberg, M.D. (2003). Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J. Neurosci. Res.* 74, 891-897.
- Rees, M.L., Lien, C.F., and Gorecki, D.C. (2007). Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. *Neuromuscul. Disord.* 17, 123-134.
- Rohloff, P., and Docampo, R. (2008). A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 118, 17-24.
- Rossi, D., and Volterra, A. (2009). Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res. Bull.* 80, 224-232.
- Rouach, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell Biol.* 149, 1513-1526.
- Rubie, C., Lichtner, P., Gartner, J., Siekiera, M., Uziel, G., Kohlmann, B., Kohlschutter, A., Meitinger, T., Stober, G., and Bettecken, T. (2003). Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Hum. Mutat.* 21, 45-52.
- Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81, 2573-2604.
- Russwurm, C., Zoidl, G., Koesling, D., and Russwurm, M. (2009). Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 284, 25782-25790.
- Saez, J.C., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F., Retamal, M.A., and Bennett, M.V. (2003). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol. Scand.* 179, 9-22.
- Saez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukauskas, F.F., and Bennett, M.V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 215-224.
- Saijo, H., Nakayama, H., Ezo, T., Araki, K., Sone, S., Hamaguchi, H., Suzuki, H., Shiroma, N., Kanazawa, N., Tsujino, S., Hirayama, Y., and Arima, M. (2003). A case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der Knaap disease): molecular genetic study. *Brain Dev.* 25, 362-366.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sait, S.N., Claydon, M.A., Conroy, J.M., Nowak, N.J., Barcos, M., and Baer, M.R. (2007). Translocation (4;11)(p12;q23) with rearrangement of FRYL and MLL in therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 177, 143-146.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, 381-392.

- Sawaishi, Y. (2009). Review of Alexander disease: beyond the classical concept of leukodystrophy. *Brain Dev.* 31, 493-498.
- Scheper, G.C., Proud, C.G., and van der Knaap, M.S. (2006). Defective translation initiation causes vanishing of cerebral white matter. *Trends Mol. Med.* 12, 159-166.
- Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R., and Lesch, K.P. (2003). The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* 44, 283-295.
- Sen, E., and Levison, S.W. (2006). Astrocytes and developmental white matter disorders. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 97-104.
- Sener, R.N. (2003a). The glycine peak in brain diseases. *Comput. Med. Imaging Graph.* 27, 297-305.
- Sener, R.N. (2003b). Proton MR spectroscopy demonstration of taurine peaks in megalencephalic leukoencephalopathy with cysts. *Comput. Med. Imaging Graph.* 27, 23-26.
- She K., 2003. *BioTeach Journal*, Vol. 1
- Shestopalov, V.I., and Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 376-394.
- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207-235.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8794-8797.
- Shizuya, H., and Kouros-Mehr, H. (2001). The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J. Med.* 50, 26-30.
- Shukla, P., Balakrishnan, P., Agarwal, N., Ghosh, M., Kabra, M., Sharma, R., Deka, D., and Kalra, V. (2008). Prenatal diagnosis of megalencephalic leukodystrophy. *Prenat. Diagn.* 28, 357-359.
- Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877-896.
- Singhal, B.S., Gorospe, J.R., and Naidu, S. (2003). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *J. Child Neurol.* 18, 646-652.
- Singhal, B.S., Gursahani, R.D., Udani, V.P., and Biniwale, A.A. (1996). Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr. Neurol.* 14, 291-296.
- Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G.T., and Verkman, A.S. (2004). Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286, C426-32.
- Sommer, C., Roth, S.U., and Kiessling, M. (2001). Kainate-induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 and AMPA receptor binding protein in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol.* 101, 460-468.
- Sorci, G., Agneletti, A.L., Bianchi, R., and Donato, R. (1998). Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1448, 277-289.
- Steinke, V., Meyer, J., Syagailo, Y.V., Ortega, G., Hameister, H., Mossner, R., Schmitt, A., and Lesch, K.P. (2003). The genomic organization of the murine *Mlc1* (*Wkl1*, *KIAA0027*) gene. *J. Neural Transm.* 110, 333-343.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., *et al.* (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6062-6067.
- Suzuki, M., Morita, T., and Iwamoto, T. (2006). Diversity of Cl⁻ channels. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 12-24.

- Taberero, A., Jimenez, C., Velasco, A., Giaume, C., and Medina, J.M. (2001). The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J. Neurochem.* 78, 890-898.
- Taberero, A., Medina, J.M., and Giaume, C. (2006). Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J. Neurochem.* 99, 1049-1061.
- Takanashi, J., Sugita, K., Tanabe, Y., and Niimi, H. (1998). Adolescent case of Alexander disease: MR imaging and MR spectroscopy. *Pediatr. Neurol.* 18, 67-70.
- Talhok, R.S., Zeinieh, M.P., Mikati, M.A., and El-Sabban, M.E. (2008). Gap junctional intercellular communication in hypoxia-ischemia-induced neuronal injury. *Prog. Neurobiol.* 84, 57-76.
- Tang, G., Yue, Z., Tallozy, Z., Hagemann, T., Cho, W., Messing, A., Sulzer, D.L., and Goldman, J.E. (2008). Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1540-1555.
- Tang, V.W., and Goodenough, D.A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J.* 84, 1660-1673.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A., and Estevez, R. (2007). Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.* 26, 532-545.
- Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M., and Estevez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2581-2594.
- Tepass, U. (2003). Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nat. Cell Biol.* 5, 595-597.
- Thelle, T., Balslev, T., and Christensen, T. (1999). Van der Knaap's vacuolating leukoencephalopathy: two additional cases. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 3, 83-86.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* 88, 983-1008.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Ozguc, M., and Seboun, E. (2000). Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 733-739.
- Topcu, M., Saatci, I., Topcuoglu, M.A., Kose, G., and Kunak, B. (1998). Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Dev.* 20, 142-153.
- Tran, M.D., Wanner, I.B., and Neary, J.T. (2008). Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 105, 272-286.
- Tsujino, S., Kanazawa, N., Yoneyama, H., Shimono, M., Kawakami, A., Hatanaka, Y., Shimizu, T., and Oba, H. (2003). A common mutation and a novel mutation in Japanese patients with van der Knaap disease. *J. Hum. Genet.* 48, 605-608.
- Turner, C.E. (2000a). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2, E231-6.
- Turner, C.E. (2000b). Paxillin interactions. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23, 4139-4140.
- Ungar, D., and Hughson, F.M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 493-517.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., and Valk, J. (1995a). Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.* 37, 324-334.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F., and Valk, J. (1996). Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.* 92, 206-212.
- van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., and Scheper, G.C. (2006a). Vanishing white matter disease. *Lancet Neurol.* 5, 413-423.

- van der Knaap, M.S., Ramesh, V., Schiffmann, R., Blaser, S., Kyllerman, M., Gholkar, A., Ellison, D.W., van der Voorn, J.P., van Dooren, S.J., Jakobs, C., Barkhof, F., and Salomons, G.S. (2006b). Alexander disease: ventricular garlands and abnormalities of the medulla and spinal cord. *Neurology* 66, 494-498.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G., and Tortori Donati, P. (1995b). Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology* 37, 679-686.
- van der Voorn, J.P., van Kollenburg, B., Bertrand, G., Van Haren, K., Scheper, G.C., Powers, J.M., and van der Knaap, M.S. (2005). The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 770-775.
- van Kollenburg, B., van Dijk, J., Garbern, J., Thomas, A.A., Scheper, G.C., Powers, J.M., and van der Knaap, M.S. (2006). Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 707-715.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., and Freeman, W.M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44, 619-626.
- Vaz-de-Lima, B.B., Ionta, M., and Machado-Santelli, G.M. (2008). Changes in cell morphology affect the quantification of intercellular communication. *Micron* 39, 631-634.
- Vazquez-Juarez, E., Ramos-Mandujano, G., Hernandez-Benitez, R., and Pasantes-Morales, H. (2008). On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell. Physiol. Biochem.* 21, 1-14.
- Vedula, S.R., Lim, T.S., Kausalya, P.J., Hunziker, W., Rajagopal, G., and Lim, C.T. (2005). Biophysical approaches for studying the integrity and function of tight junctions. *Mol. Cell. Biomech.* 2, 105-123.
- Verma, R., Mukerji, M., Grover, D., B-Rao, C., Das, S.K., Kubendran, S., Jain, S., and Brahmachari, S.K. (2005). MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol. Psychiatry* 58, 16-22.
- Vogt, A., Hormuzdi, S.G., and Monyer, H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 141, 113-120.
- Wachtel, M., Bolliger, M.F., Ishihara, H., Frei, K., Bluethmann, H., and Gloor, S.M. (2001). Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurochem.* 78, 155-162.
- Waite, A., Tinsley, C.L., Locke, M., and Blake, D.J. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann. Med.* 41, 344-359.
- Wolff, J.R., Stuke, K., Missler, M., Tytko, H., Schwarz, P., Rohlmann, A., and Chao, T.I. (1998). Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: a new view on cellular autoregulation during process formation. *Glia* 24, 121-140.
- Yakinci, C., Soylu, H., Kutlu, N.O., and Sener, R.N. (1999). Leukoencephalopathy with a mild clinical course: a case report. *Comput. Med. Imaging Graph.* 23, 169-172.
- Yalcinkaya, C., Yuksel, A., Comu, S., Kilic, G., Cokar, O., and Dervent, A. (2003). Epilepsy in vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Seizure* 12, 388-396.
- Yamane, Y., Shiga, H., Asou, H., and Ito, E. (2002). GAP junctional channel inhibition alters actin organization and calcium propagation in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 112, 593-603.
- Yong, J., Tonghui, MA. (2007) Importance of NPA Motifs in the Expression and Function of Water Channel Aquaporin-1. *Chinese Science Bulletin* 2007, 52(6) 771-776
- Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y., and Ozawa, E. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur. J. Biochem.* 222, 1055-1061.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Court, D.L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5978-5983.

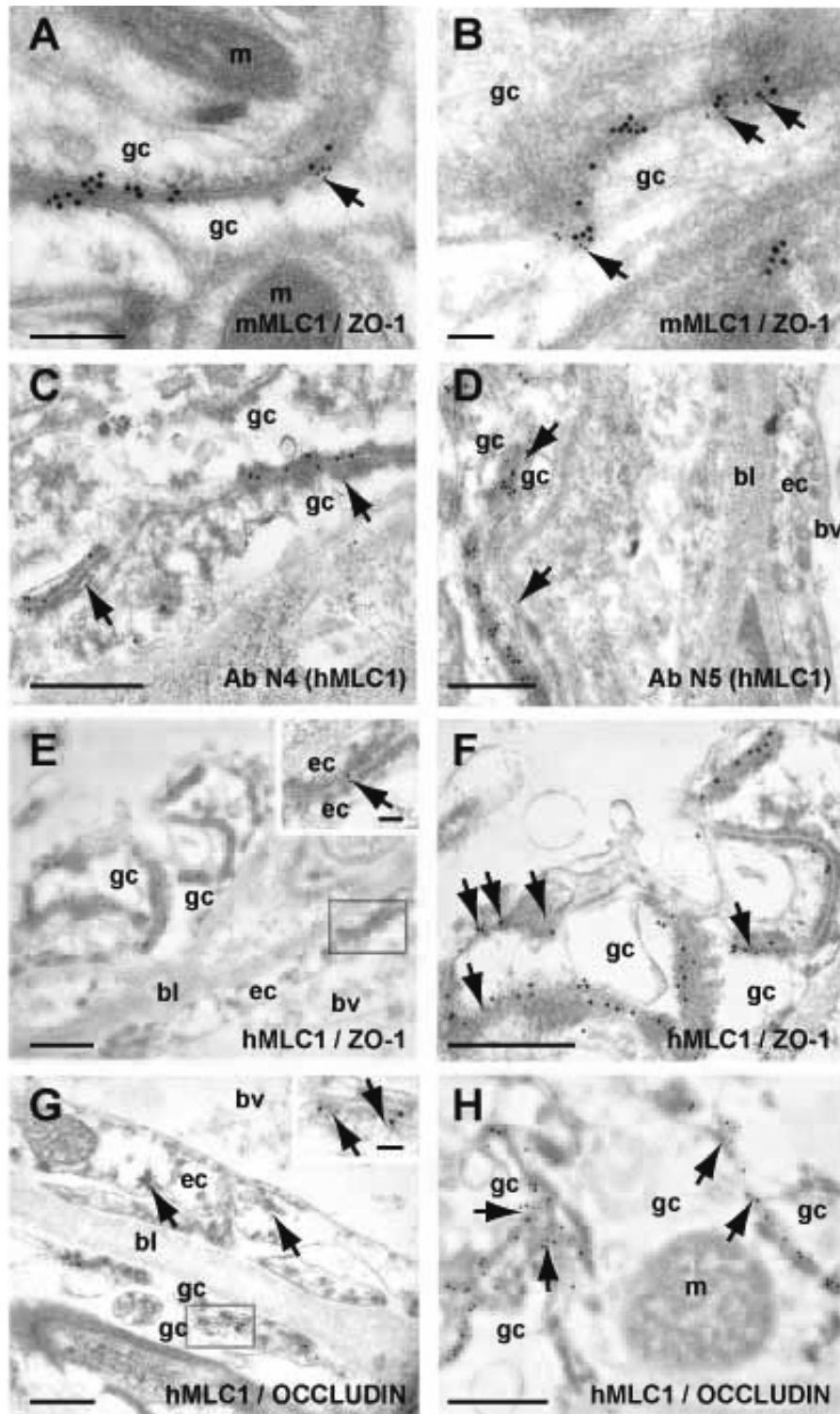
- Zappala, A., Li Volti, G., Serapide, M.F., Pellitteri, R., Falchi, M., La Delia, F., Cicirata, V., and Cicirata, F. (2007). Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. *Neuroscience* 148, 653-667.
- Zhang, D., Stumpo, D.J., Graves, J.P., DeGraff, L.M., Grissom, S.F., Collins, J.B., Li, L., Zeldin, D.C., and Blackshear, P.J. (2006). Identification of potential target genes for RFX4_v3, a transcription factor critical for brain development. *J. Neurochem.* 98, 860-875.
- Zhang, Y., Kanter, E.M., Laing, J.G., Aprhys, C., Johns, D.C., Kardami, E., and Yamada, K.A. (2008). Connexin43 expression levels influence intercellular coupling and cell proliferation of native murine cardiac fibroblasts. *Cell. Commun. Adhes.* 15, 289-303.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P., and Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20, 123-128.
- Zhou, J., and Sutherland, M.L. (2004). Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J. Neurosci.* 24, 6301-6306.

Pàgines web consultades:

- <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/nervous/nervous.htm>
- <http://www.utexas.edu/courses/bio365r/documents/about/about.php>
- <http://medinfo.ufl.edu/pa/chuck/summer/handouts/epi.htm>
- www.dmd.nl
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html>
- <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>
- <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- <http://www.roche.com/products/product-list.htm?type=divres&id=Researchers>
- https://tools.invitrogen.com/.../virapower_adenoviral_system_man.pdf
- <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0027/>
- <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main_group=gene_analysis&sub1=target_vector_construction
- <http://bacpac.chori.org/>
- <http://genome.ucsc.edu/>

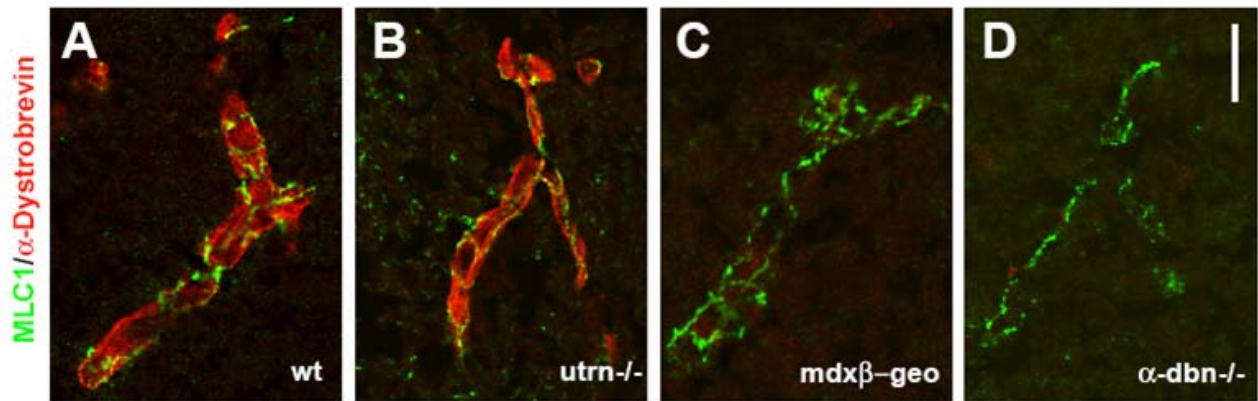
ANNEXOS

ANNEX 1.

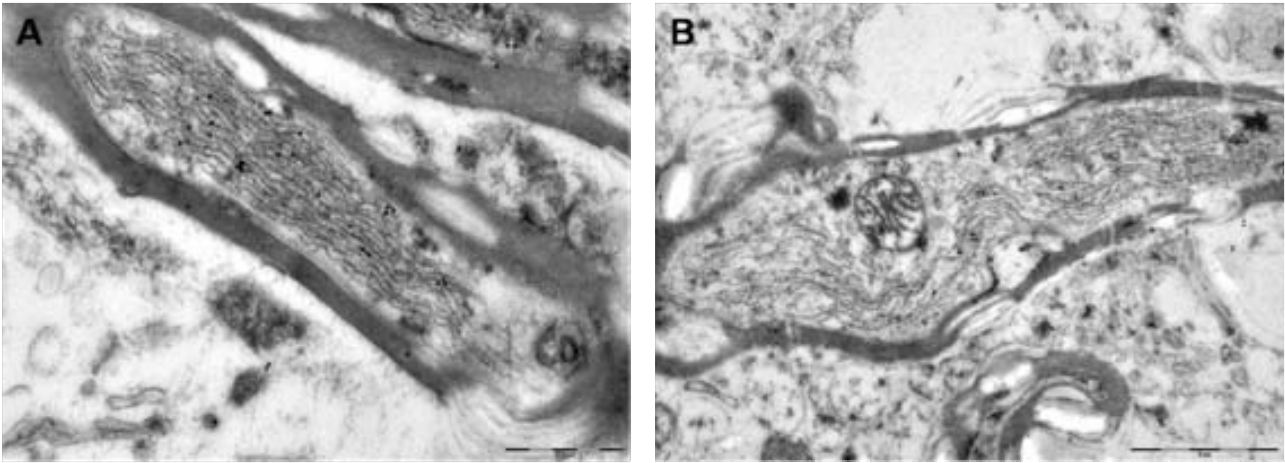


Annex 1. Localització de MLC1 de ratolí i d'humà en unions astrocitàries en teixit. (A-B) Exemples de dobles *immunogolds* mostrant colocalització de MLC1 (partícules d'or de 18 nm) i ZO-1 (partícules de 12 nm, fletxes) en unions astròcit-astròcit en teixit de ratolí. (C-H) En teixit humà, els anticossos contra MLC1 N4 (C) i N5 (D) també mostren la localització de MLC1 en unions astrocitàries (fletxes) a hipocamp, colocalitzant amb ZO-1 (fletxes en E i F). També es detecten partícules corresponents a ZO-1 en unions entre cèl·lules epitelials, però no s'hi detecta MLC1 (requadre en E), (F) és una magnificació de les unions astrocitàries de E. També s'observa colocalització amb occludina (fletxes en G i H) a cerebel, on l'occludina també marca les unions endotelials (fletxes en G). Barres, (A-H) 500 nm i (magnificacions d'E i G) 100 nm.

ANNEX 2.



Annex 2. Immunohistoquímiques de MLC1 en cervell de ratolí wt en comparació amb cervells procedents de diferents ratolins distròfics. (A) La reacció immunològica de MLC1 (en verd) es detecta al voltant de la microvasculatura i dels capil·lars del cervell d'un ratolí wt. No s'observen canvis en l'expressió de MLC1 en els ratolins *knock-outs* de proteïnes del DGC, com utrophin (*utrn*^{-/-}, B), dystrophyn (*mdxβ-geo*, C) i α -dystrobrevin (α -*dbn*^{-/-}, D). La tinció amb α -dystrobrevin (en vermell) es localitza als peus astrocitaris i desapareix la senyal en el complex DG. Barra, 20 nm.

ANNEX 3.

Annex 3. Imatges de microscopia electrònica d'*immunogold* de MLC1 a teixit humà. (A) Partícules d'or de 18 nm corresponents a MLC1 detectades a tractes axonals mielinitzats en cerebel humà. (B) La mateixa senyal es detecta a axons neuronals d'hipocamp. Barra, 500 nm.

ANNEX 4.

Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 23 3728–3739
doi:10.1093/hmg/ddn269
Advance Access published on August 30, 2008

Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in *MLC1* cause folding defects

Anna Duarri^{1,2,4,5,†}, Oscar Tejjido^{8,†}, Tania López-Hernández^{2,†}, Gert C. Scheper¹⁰, Herve Barriere¹¹, Ilja Boor¹⁰, Fernando Aguado⁹, Antonio Zorzano^{7,8}, Manuel Palacín^{5,6}, Albert Martínez⁹, Gergely L. Lukacs¹¹, Marjo S. van der Knaap¹⁰, Virginia Nunes^{1,3,4,†} and Raúl Estévez^{2,5,8,*,†}

¹CGMM-IDIBELL Gran Via s/n Km. 2,7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain, ²Sección de Fisiología and ³Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, IDIBELL-Universidad de Barcelona, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain, ⁴CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-730, ISCIII, ⁵CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-750, ISCIII, ⁶CIBER de enfermedades raras (CIBERER), U-731, ISCIII, ⁷CIBERDEM, ISCIII, Barcelona, Spain, ⁸Department of Biochemistry and Molecular Biology and ⁹Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Institute for Research in Biomedicine (IRB), Josep Samitier 1-5, Barcelona E-08028, Spain, ¹⁰Department of Pediatrics/Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands and ¹¹Department of Physiology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3G 1Y6

Received July 24, 2008; Revised and Accepted August 28, 2008

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy, most often caused by mutations in the *MLC1* gene. *MLC1* is an oligomeric plasma membrane (PM) protein of unknown function expressed mainly in glial cells and neurons. Most disease-causing missense mutations dramatically reduced the total and PM *MLC1* expression levels in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. The impaired expression of the mutants was verified in primary cultures of rat astrocytes, as well as human monocytes, cell types that endogenously express *MLC1*, demonstrating the relevance of the tissue culture models. Using a combination of biochemical, pharmacological and imaging methods, we also demonstrated that increased endoplasmic reticulum-associated degradation and endo-lysosomal-associated degradation can contribute to the cell surface expression defect of the mutants. Based on these results, we suggest that *MLC1* mutations reduce protein levels *in vivo*. Since the expression defect of the mutants could be rescued by exposing the mutant-protein expressing cells to low temperature and glycerol, a chemical chaperone, we propose that MLC belongs to the class of conformational diseases. Therefore, we suggest the use of pharmacological strategies that improve *MLC1* expression to treat MLC patients.

INTRODUCTION

Leukodystrophies encompass a broad spectrum of inherited neurodegenerative disorders that affect brain white matter (1,2). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare new leukodystrophy (3–6). Recognition

of MLC was made possible only 13 years ago by means of magnetic resonance imaging (5,7). Its clinical characteristics are macrocephaly noted in the first years of life, motor disability and mild cognitive decline (5,8,9). In contrast to many other leukodystrophies, MLC progression is very slow (5,10,11).

*To whom correspondence should be addressed. restevez@ub.edu

†These authors contributed equally to this study.

Mutations in the *MLC1* gene are the main cause of disease (12–14), although other unknown genes are also involved (15,16). In addition, there is a high intrafamilial variability, which may indicate the influence of modifier genes or environmental factors in the disease phenotype (13).

MLC1 is an oligomeric membrane protein with eight predicted transmembrane segments (17). Its homology to carrier proteins and its confinement to the plasma membrane (PM) suggest that it may mediate substrate translocation across the cell surface (12,18). Unfortunately, its precise role in the cellular physiology has not been identified yet (17,19).

Expression studies with RNA and antibody probes indicated that MLC1 is located in two neural populations: glial cells (17,20–23) and neurons (17,20). Specifically, in glial cells, it is concentrated in membrane contact regions, being enriched in distal glial processes and Bergman cerebellar glia. At present, it is still uncertain whether MLC1 is localized in membrane contact regions between endothelial cells and glial cells (i.e. forming part of the dystrophin glycoprotein complex) or in membrane contact regions between different glial cells (20,23,24). Although the exact localization has to be defined, the closer relationship with brain barriers suggest that MLC1 could participate in transport processes across the blood-brain and brain-cerebrospinal fluid barriers.

To study the molecular basis of the disease, in a previous work, we described a biochemical method to measure the levels of MLC1 protein at the PM in heterologous systems (17). Two studies with eight different *MLC1* mutations (17,25) showed that mutations led to a reduced protein dosage. Here, we studied most of the *MLC1* missense mutations (including one in-frame deletion) identified to date in heterologous systems as well as in primary rat astrocytes, a cell system with endogenous expression of MLC1 (26). Our results clarify the degradation pathways that follow these mutants. Moreover, using a new generated antibody, we showed for the first time that mutations also dramatically decrease the levels of MLC1 in cells from MLC patients. The data presented here provide insights for understanding the relationship between the clinical phenotypes and the molecular defects of the protein. This work suggests that a common therapy used to improve MLC1 protein expression may be useful for the treatment of MLC patients.

RESULTS

Reduced PM expression of most MLC1 mutants

MLC1 gene encodes a membrane protein with a low degree of homology to the Kv1.1 potassium channel (13,18). We and others have failed to detect ion channel activity after its expression in several heterologous systems (17,19). As an alternative approach, we described a biochemical method to quantify the PM levels of MLC1 (17). To study the effect of most of the missense mutations including a deletion in a conserved poly-leucine stretch (26,27) (Fig. 1A), we introduced each of these mutations in human MLC1 containing two HA epitope tags and assayed the PM expression in the *Xenopus* oocyte system (Fig. 1B). We also measured protein expression levels by western blot analysis of total protein extracts. The same parameters were analysed in selected mutations in HeLa

cells (Fig. 1C). Differences in surface expression for different mutants were found between these two systems, probably because the *Xenopus* oocyte is more permissive to folding mutants (28), due to its lower incubation temperature (18°C).

Most mutations dramatically reduced PM levels (Fig. 1). Western-blot analyses of cell extracts showed that steady-state protein values were also reduced in parallel (data not shown). We classified the mutations in three classes on the basis of their effect on PM expression levels: severe mutations (in black) reduced PM levels to less than 35% of wild-type (wt) MLC1 value in oocytes, intermediate mutations with PM levels >35% of wt MLC1 value in oocytes and PM levels <10% of wt MLC1 value in HeLa cells (in grey) and mild mutations with PM levels >10% of wt MLC1 value in HeLa cells (in white). P294L mutant was considered as severe (not shown) on the basis of its total protein levels. Of the 21 mutants studied, only three (N141K, S246R and the deletion in frame of leucines 304 and 305) had slightly reduced or similar PM levels compared with wt MLC1.

Reduced stability of MLC1 mutants

We subsequently studied the protein stability of selected mutants of each class by measuring the remaining protein after incubation with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (Fig. 2). For reasons of clarity, in western blot experiments, we only focused on the band corresponding to the monomeric form of MLC1, because it is the most abundant. Severe mutants (C326R and V210D) were less stable than intermediate (G59E) or mild mutants (S246R), suggesting that reduced PM protein levels mirror protein stability values (Fig. 2).

Intracellular retention of MLC1 mutants

The reduced stability of the mutants was suggestive of altered intracellular processing. It is feasible to study the intracellular processing of glycoproteins, such as CFTR (29), because by monitoring their glycosylation state by western blot one can distinguish between the endoplasmic reticulum (ER) resident protein and the fully glycosylated mature protein. Unfortunately, although MLC1 has a putative glycosylation site between the putative transmembrane domains 3 and 4, it is not glycosylated (17) (Fig. 3B). We constructed a chimeric protein with glycosylation sites in this predicted extracellular loop (MLC1GLYC, Fig. 3A) as a way to follow its intracellular processing. Whereas wt MLC1 size was not altered after treatment with Endoglycosidase F (EndoF) (Fig. 3B), which removes most of the glycans, the size of the heavy molecular weight bands of MLC1GLYC was reduced, indicating that it was, in fact, glycosylated (Fig. 3B, bracket). A minor proportion did not change its size after EndoF treatment, probably indicating a non-glycosylated protein fraction (Fig. 3B, arrow).

We next addressed the sensitivity of MLC1GLYC to Endoglycosidase H (EndoH), because it indicates the presence of proteins that have not yet been processed beyond the ER. Most of the glycosylated protein was insensitive to EndoH (Fig. 3C, bracket), indicating that it was fully processed, and only a minor proportion of glycosylated protein (Fig. 3C, asterisk) was EndoH sensitive, probably indicating the

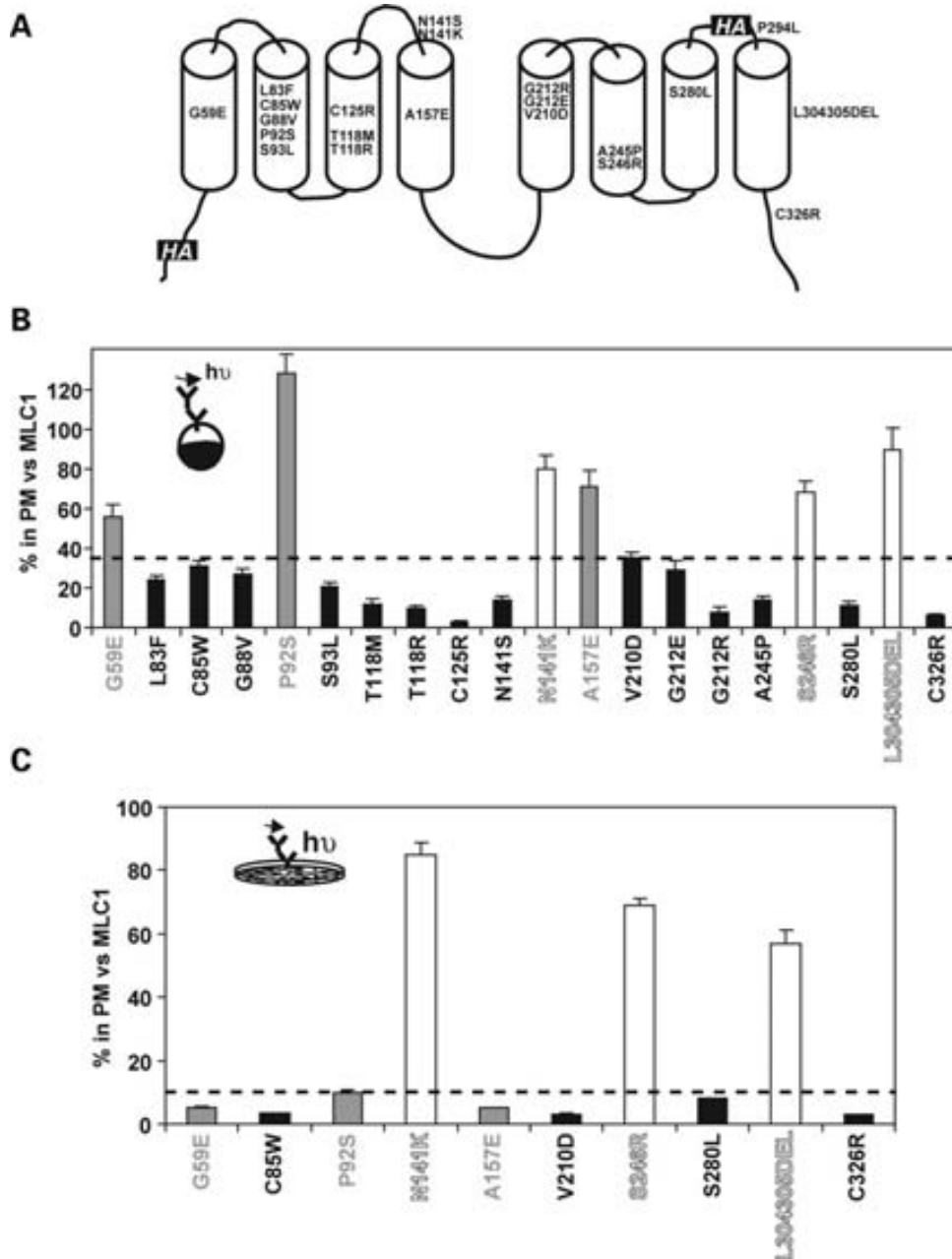


Figure 1. Reduced PM expression of most MLC1 mutants in *Xenopus* oocytes and HeLa cells. (A) A predicted 2D model of the MLC1 protein, showing the location of the mutations studied and the introduced HA epitope tags. (B) Oocytes were injected with 10 ng of each cRNA construct, and the PM levels were measured using a luminescence-based method. The signal of non-injected oocytes was always below 5% the signal of wild-type (wt) MLC1-injected oocytes. Surface expression was normalized with the expression of wt MLC1. Data correspond to the summary of three experiments with $n \geq 30$ oocytes per construct. The inset shows an overview of the method. The total protein steady-state levels were reduced in parallel with their surface expression level (not shown). The dotted line indicated 35% in PM versus wt MLC1, a criteria used to classify the mutants. (C) PM analysis using a luminescence-based method in HeLa cells transfected with wt MLC1 or the selected mutants. Surface expression was normalized with the expression of wt MLC1. Data correspond to two or three experiments with $n \geq 8$ data points per construct. The inset shows an overview of the method. Total protein levels of each mutant were analysed at least twice in western blot studies. The dotted line indicated 10% in PM versus wt MLC1, a criteria used to classify the mutants. Mutations were classified in three classes on the basis of their effect on PM expression levels: severe (in black), intermediate (in grey) and mild (in white).

ER-resident form. In agreement with being fully processed, we were able to detect MLC1GLYC at the surface by luminescence-based experiments (data not shown).

We subsequently introduced selected mutations into the reporter MLC1GLYC and addressed the post-translational modifications in their glycosylation (Fig. 3C). Whereas

a mild mutant as MLC1GLYC S246R was very similar to MLC1GLYC protein, severe mutants as MLC1GLYC S280L or MLC1GLYC C326R did not acquire a fully glycosylated state. In these severe mutants, the glycosylated band was sensitive to EndoH treatment, indicating that these mutants were not able to reach the medial Golgi compartment (Fig. 3C).

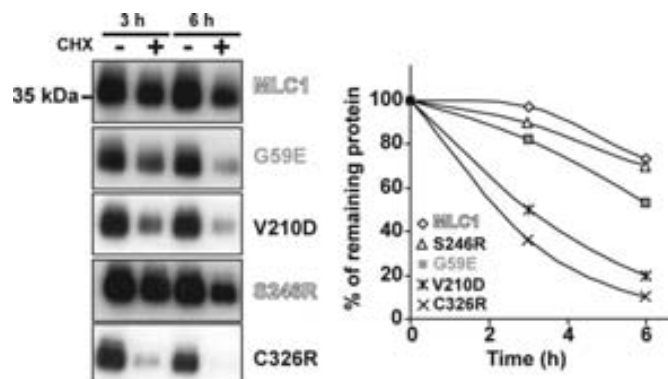


Figure 2. Decreased stability of MLC1 mutants. HeLa cells transfected with wt MLC1 or the G59E, V210D, S246R and C326R mutants containing HA tags were incubated with the protein synthesis inhibitor CHX (100 μ g/ml) for the times indicated (0, 3 and 6 hours). Cells were harvested, solubilized and processed by western blot against the HA epitope. No signal was detected in non-transfected cells. Exposure times varied for the mutants in order to clearly show the decrease in steady-state protein levels. Here, we also show that expression levels of the proteins without CHX were similar at all times indicated. On the right, a quantification of this experiment with adequate exposition times, using ImageJ software, is shown. Ponceau staining was used as a loading control. Two independent experiments gave similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

Lysosomal targeting and degradation of MLC1 mutants

Taken together, these experiments suggested that most mutants are retained in the ER, where they will probably be targeted for degradation by the proteasome. However, we found that some mutants can partially reach the PM (Fig. 1). We speculated that these mutants could be degraded in lysosomes. To address what were the degradation pathways, we measured the remaining protein of selected mutants after incubation with the protein synthesis inhibitor CHX in the presence of a proteasomal inhibitor (MG132), or in the presence of two different lysosomal inhibitors (ammonium chloride and pepstatin plus leupeptin) (30) (Fig. 4A). These inhibitors increased protein levels with different efficiencies (Fig. 4A). The house-keeping β -actin protein was used as a loading control. These experiments suggested that both ERAD and ELAD contribute to their degradation.

Conceivably, mutants might reach the lysosomes from the PM. To explore this possibility, we first studied the turnover of a selected intermediate mutant (in order to have enough detection sensitivity) at the cell surface (P92S). The cell-surface half-life ($T_{1/2}$) of P92S mutant was about 10 times lower ($T_{1/2} \sim 4$ h) than that of the wt MLC1, determined by the disappearance of the anti-HA antibody binding in the presence of CHX (Fig. 4B). Similar results were obtained for the severe mutant S280L (19).

Next, we determined the destination of internalized mutants by monitoring the vesicular pH of MLC1 containing vesicles (Fig. 4C). Transiently transfected COS cells were incubated with anti-HA antibody complexes with Fab fragments conjugated to the pH-sensitive fluorophore FITC. We used COS cells, because they have increased total and surface expression of the mutants. The antibody-MLC1 complex was internalized and chased at 37°C. The luminal pH of MLC1-positive intracellular vesicles was accomplished by fluorescence ratiometric

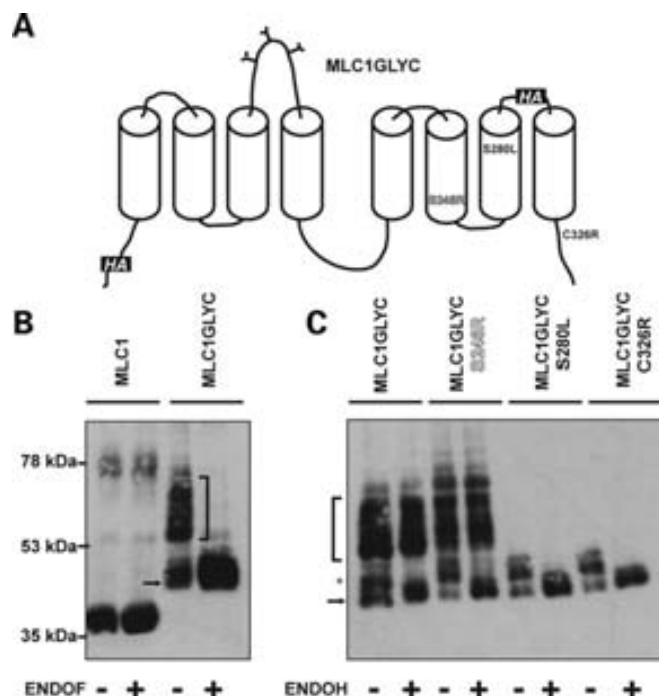


Figure 3. ER retention of MLC1 mutant proteins. (A) Schematic 2D model of the chimera MLC1GLYC reporter protein, indicating the highly glycosylated loop from the LAT4 transporter (44), added between the putative transmembrane domains 3 and 4, the presence of the two HA epitope tags and the mutations studied with this reporter protein. (B) Extracts from transfected HeLa cells with wt MLC1 or MLC1GLYC containing HA tags were treated with Endoglycosidase F (EndoF), which cleaved glycans of both the high-mannose and the complex type linked through asparagine to the protein backbone. No change in the motility of wt MLC1 was observed after incubating with EndoF; in contrast, the motility of the heavy molecular weight bands from MLC1GLYC (bracket) was reduced, indicating that it was glycosylated. Probably, the lower molecular band of MLC1GLYC (arrow) corresponds to an unglycosylated protein form. The band around 78 kDa of wt MLC1 probably corresponds to the dimeric form. (C) Extracts from transfected HeLa cells with MLC1GLYC alone or MLC1GLYC containing selected mutations were processed by incubation with Endoglycosidase H (EndoH), which is able to remove glycans only if they have not suffered modifications in the Golgi complex. A high molecular weight broad band (bracket) EndoH insensitive in MLC1GLYC and MLC1GLYC S246R was not present in MLC1GLYC S280L or MLC1GLYC C326R. Only a lower molecular weight minor band (asterisk), that was the only glycosylated protein form present in the mutants S280L and C326R was sensitive to EndoH. These results suggest that these mutants are mostly retained in the ER. The band with lower molecular weight (arrow) of MLC1GLYC probably corresponds to an unglycosylated protein form, because its motility does not change after EndoH or EndoF treatment. Another independent experiment gave similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

video image analysis as described previously for a panel of internalized cargo (31,32). Internalized MLC1 was detected mainly in vesicles with luminal pH of 6.4 ± 0.02 ($n = 468$ vesicles) (Fig. 4C), typical of recycling endosomes. In contrast, intermediate mutants G59E and P92S or severe mutants V210D, S280L and C326R were mainly confined to vesicles with luminal pH ≤ 5.3 ($n > 475$ vesicles) (Fig. 4B), characteristic of late endosomes and lysosomes, a finding consistent with their increased cell surface turnover. Mild mutants S246R and N141K were also mainly present in recycling endosomes.

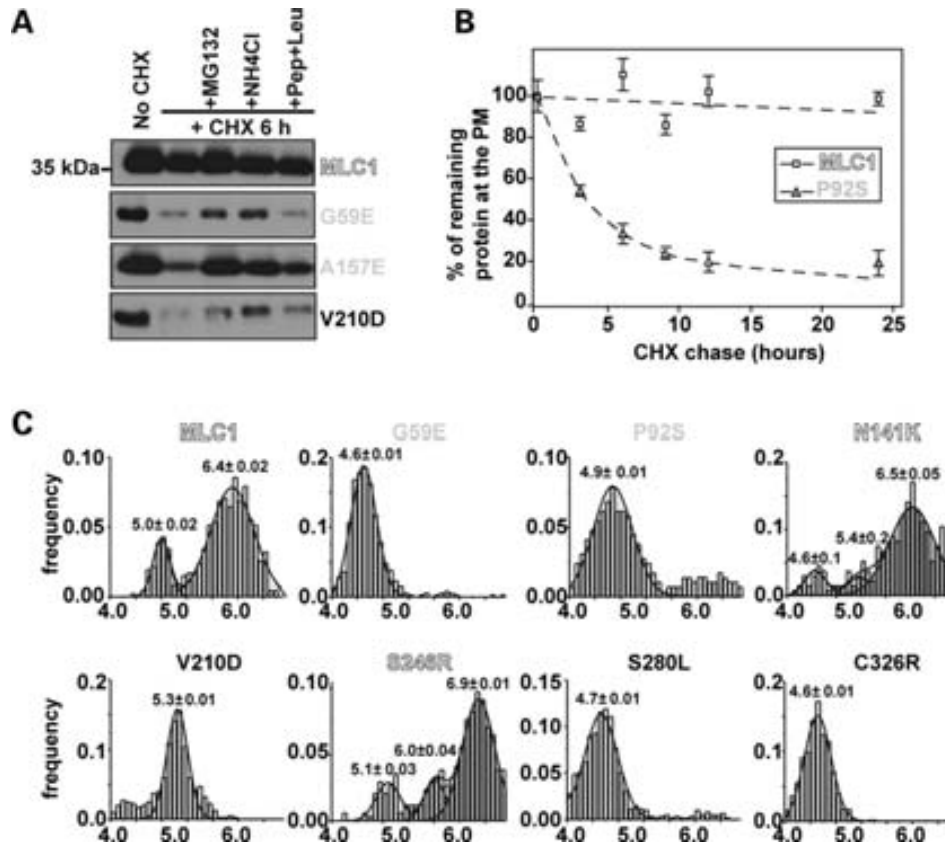


Figure 4. Lysosomal degradation of MLC1 mutants. (A) Transfected HeLa cells with wt MLC1 or the indicated mutants containing HA tags were incubated or not 24 h after transfection with the protein synthesis inhibitor CHX (100 μ g/ml) for 6 h plus the proteasomal inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132, 50 μ M) or several lysosomal inhibitors [ammonium chloride (NH₄Cl, 10 mM) or pepstatin plus leupeptin (Pep + Leu, 5 μ g/ml each)]. Cell extracts were obtained and processed by western blot. From three different experiments, for mutants G59E, A157E and V210D, respectively, densitometry studies indicated that MG132 increased mutant expression levels (in percentage) to 22, 31, 36; ammonium chloride to 21, 32, 33 and pepstatin plus leupeptin to 8, 13, 9. β -actin protein detection was used as a loading control. (B) Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with CHX. At a range of time points, cells were washed and fixed. PM levels were measured using a luminescence-based method. The signal was normalized to the value at time 0 for each of the experimental groups (wt MLC1 or P92S). The result is a representative experiment of two experiments with similar results. (C) Transiently transfected COS cells were incubated at 37°C for 90 min with FITC-conjugated anti-mouse Fab fragments and anti-HA antibody and chased in the absence of antibodies for 30 min before live imaging. The pH of individual vesicles was measured by fluorescence ratiometric video-image analysis. The figure shows the vesicular pH distribution of endocytosed wt MLC1 and MLC1 mutants. These distributions were obtained from 468, 482, 567, 671, 604, 529, 615 and 639 vesicles for wt MLC1, G59E, P92S, N141K, V210D, S246R, S280L and C326R, respectively. They were obtained in three independent experiments. The results show that severe and intermediate MLC1 mutants are mostly localized in lysosomes after internalization from the PM. A minor proportion of wt MLC1 protein is also targeted to lysosomes, probably as a consequence of the overexpression. Mild mutants N141K and S246R were similar to wt MLC1, although a three-Gaussian distribution was used to fit the average pH of each type of vesicle population (see Material and Methods). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

Biochemical investigation of MLC1 mutants in astrocytes

The rapid turnover of the mutants could be due to the heterologous systems used (oocytes, HeLa and COS cells), which do not express MLC1 endogenously. Experimental work by several groups has detected *MLC1* mRNA and protein in brain astrocytes (17,21–23). We, therefore, isolated primary rat cortical brain astrocytes and confirmed its expression (not shown). Initially, we co-transfected wt MLC1 and selected mutants together with the GFP-tagged pleckstrin homology domain of PLC δ 1 (PH-GFP), a fluorescent protein probe that labels the PM (33). No HA antibody signal was detected in non-transfected astrocytes (Fig. 5A). MLC1 was detected at the PM, mainly colocalizing with PH-GFP (yellow staining) (Pearson's correlation coefficient: $R_r = 0.8 \pm 0.02$, $n = 10$). In contrast, the intermediate mutant G59E or the severe mutants A245P and S280L were almost exclusively detected

in intracellular compartments (Fig. 5A), showing less degree of colocalization with PH-GFP (G59E: $R_r = 0.5 \pm 0.07$; A245P: $R_r = 0.4 \pm 0.05$; S280L: $R_r = 0.4 \pm 0.07$; $n = 10$). Interestingly, although the mild mutant S246R was also detected at the PM, intracellular staining was greater than that of wt MLC1 (Fig. 5A), as measured in a reduced colocalization with PH-GFP ($R_r = 0.6 \pm 0.04$, $n = 10$).

These experiments suggested that the measured severity of the mild mutant S246R was higher in the astrocyte model. To verify these results with another experimental approach, we decided to study this mutant in more detail, performing biochemical quantification experiments of protein levels, as described before. Viral systems allow a high efficiency of expression in primary cultures. We, therefore, constructed adenoviruses expressing wt MLC1 or the mutant S246R. Infecting with these adenoviruses at different MOI revealed that the expression of mutant S246R was reduced at all MOI studied

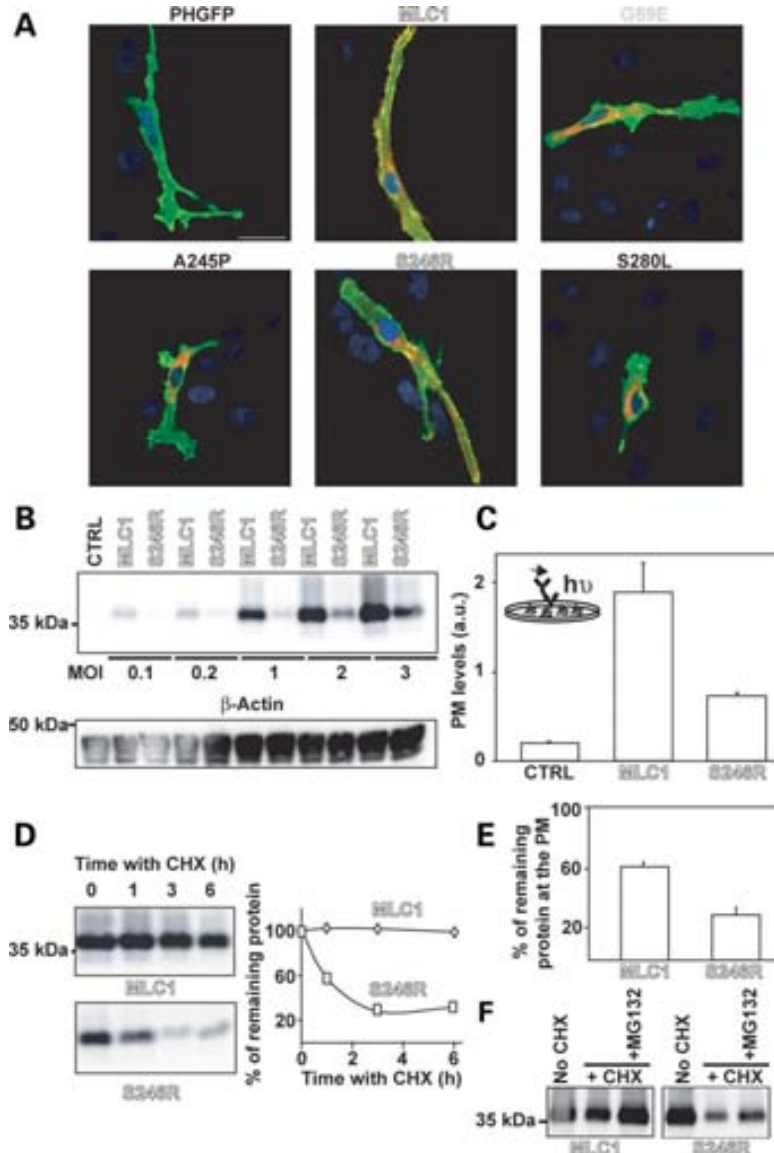


Figure 5. Expression of MLC1 mutants in rat primary astrocyte cultures. (A) Astrocytes were co-transfected with PH-GFP (pleckstrin homology domain of PLC δ 1 fused to green fluorescent protein), as a marker of PM, together with wt MLC1 or the indicated mutants (G59E, A245P, S246R and S280L) containing HA tags. Cells were fixed and permeabilized, and immunofluorescence was performed using 3F10 (against the HA tags) as a primary antibody. No signal due to the HA epitope was observed in cells transfected only with the PH-GFP plasmid. The bar line correspond to 20 μ m. Nuclei were stained using DAPI. PH-GFP is shown in green, MLC1 in red, nuclei in blue and colocalization between the green channel and the red channel in yellow. The degree of colocalization between PH-GFP and MLC1 proteins was analysed using the Pearson's correlation coefficient (Rr) obtained with an ImageJ software plugin, using 10 single plane images from different cells corresponding to two independent experiments. The values of Rr were 0.8 ± 0.02 , 0.5 ± 0.07 , 0.4 ± 0.05 , 0.6 ± 0.04 and 0.4 ± 0.07 for wt MLC1, G59E, A245P, S246R and S280L, respectively. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1. (B) Astrocytes were infected or not with adenoviruses expressing wt MLC1 or S246R mutant containing two HA tags at different MOI. Forty-eight hours later, extracts were obtained and analysed by western blot. At equal MOI, the expression of the S246R mutant was always lower than wt MLC1. β -Actin detection by western blot was used as a loading control. (C) Astrocytes were infected with adenoviruses expressing wt MLC1 or the mutant S246R with HA tags at MOI = 2. PM levels of wt MLC1 and S246R mutant were measured using a luminescence-based method, as described in Materials and Methods. The luminescence signal of non-infected astrocytes was always lower than the signal from infected astrocytes with MLC1 proteins. Data correspond to an independent experiment with four data points per construct, and are expressed in light arbitrary units (a.u.). From six independent experiments ($n = 24$), the level of the S246R mutant in comparison with wt MLC1 was $26 \pm 5\%$. The inset shows an overview of the method. (D) Astrocytes were infected or not with adenoviruses expressing wt MLC1 and S246R mutant with HA tags at MOI = 2. Thirty-six hours post-infection, cells were treated or not with cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml) at the times indicated. Cell extracts were obtained, and the remaining protein was analysed by western-blot against the HA epitope. β -Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). The result is a representative experiment of three with similar results. On the right, a quantification of this experiment using ImageJ software is shown. (E) Similarly, 36 hours post-infection with the indicated adenoviruses, astrocytes were incubated or not with CHX (100 μ g/ml) for 6 h. Cells were fixed, and the levels of wt MLC1 and the S246R mutant at the PM were measured using a luminescence-based method. The signal was normalized to the value at time 0 for each of the experimental group (wt MLC1 or S246R). Data correspond to a summary of three independent experiments ($n = 12$). Wt MLC1 surface levels were reduced to $59.3 \pm 4.1\%$ and S246R mutant to $35.1 \pm 7.1\%$. (F) In a similar manner, infected astrocytes were incubated with CHX (100 μ g/ml) together or not with the proteasome inhibitor MG132 (50 μ M) for 6 h. Cell extracts were processed by western blot. β -Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). The result is a representative experiment of three with similar results. Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

(Fig. 5B). At MOI = 2, surface expression of the mutant S246R was clearly reduced to $26 \pm 5\%$ ($n = 24$) of wt MLC1 values (Fig. 5C). Incubation with CHX revealed that S246R mutant showed reduced total (Fig. 5D) and PM stability levels (Fig. 5E). Possibly, this reduced stability was due to an increased proteasomal and lysosomal degradation, as incubation with the proteasomal inhibitor MG132 only partially raised S246R mutant protein levels after CHX treatment (Fig. 5F).

MLC1 expression in human MLC patients

A major caveat regarding all the experiments described is that they may be artefacts caused by overexpression. To validate the relevance of these experiments in tissue culture models, we attempted to detect MLC1 protein levels by western blot in samples from MLC patients. We developed a new antibody against human MLC1 protein which was able to specifically detect human MLC1 expressed in HeLa cells and the endogenous expression in brain (Fig. 6A).

MLC1 mRNA was reported to be expressed in peripheral blood leukocytes (PBLs) (34). At first, we attempted to detect MLC1 protein in Epstein–Barr virus-immortalized B lymphoblasts from unaffected controls, because these cells are stable and can be propagated. Unfortunately, we were unable to detect MLC1 protein expression, which may be attributed to the very low levels of mRNA expression in lymphoblasts compared with brain tissue. In fact, quantitative real-time PCR of human lymphoblast showed that these cells expressed about 1000-fold lower (ΔC_t value, see Materials and Methods) amounts of mRNA of *MLC1* than that in brain. Due to this negative result, we tried to detect protein expression in primary PBLs cells from human unaffected controls. Additionally, to improve the detection, we separated these PBLs into monocytes and lymphocytes. A specific band, with the same size as human MLC1 detected in brain or in transfected cells, was detected in PBLs and enriched in monocytes.

To be sure that this detected band corresponded to MLC1, we studied in parallel blood monocytes and human brain from the only MLC patient (EL18) who had adequate tissue quality (35). Although the mutations in this patient are not known, it has reduced *MLC1* mRNA levels in immortalized lymphoblasts (26). Looking at MLC1 protein expression in monocytes from this patient, no band with the same size as MLC1 was detected, compared to those from a healthy control (Fig. 6B, left). Similarly, no MLC1 immunostaining was detected in brain sections from this patient (Fig. 6B, right). Thus, we concluded that monocytes could be used to follow human MLC1 endogenous protein expression.

Then, we isolated monocytes from different MLC patients with at least a missense mutation. One of these patients harbours the mild mutation S246R in homozygous state (Fig. 6C). MLC1 protein expression was detectable in control cells, but not in patient cells. In all, these results suggested that a reduced presence of the MLC1 polypeptide may be a common phenomenon for MLC patients harbouring missense mutations.

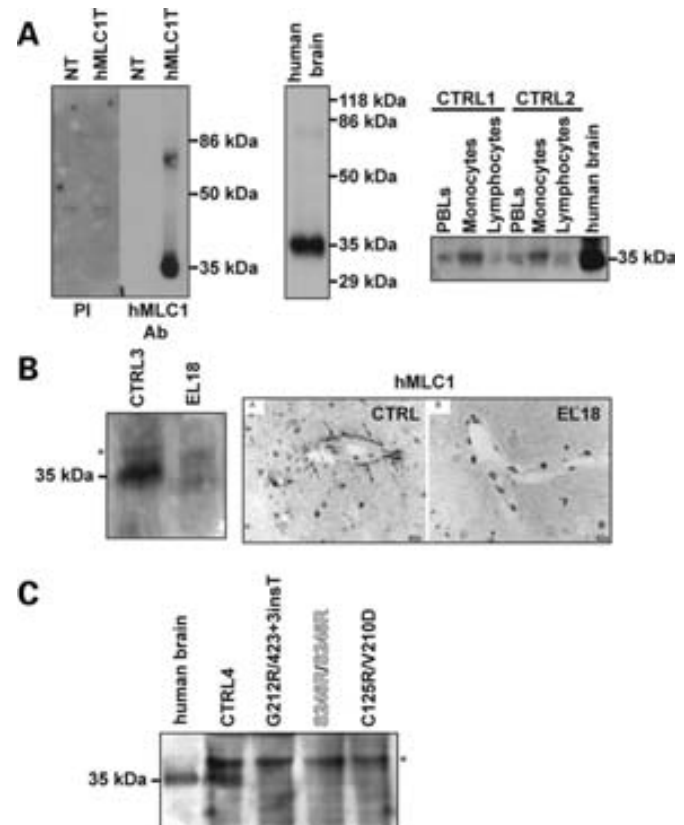


Figure 6. Analysis of MLC1 expression in human MLC patients. (A) Characterization of a new polyclonal antibody against human MLC1 protein. Left panel: affinity-purified rabbit antibody against the N-terminal region of human MLC1 recognize a ~ 34 kDa and a ~ 70 kDa band in lysates of HeLa cells transfected with human MLC1 cDNA (hMLC1T), probably corresponding to the monomeric and dimeric form, respectively. These bands were not visible in non-transfected (NT) cells or in transfected cells (hMLC1T) using the pre-immune serum (PI). Middle panel: this antibody recognizes bands of the same size in extracts from human brain tissue, without showing any unspecific band. Right panel: fresh human PBLs were obtained using a Ficoll gradient. They were further fractionated to monocytes and lymphocytes on the basis of monocyte adherence to plastic dish. Extracts were obtained and processed for western blot analysis. A band showing the same motility as the monomeric form of MLC1 detected in human brain was specifically enriched in control monocytes (CTRL1 and CTRL2). For reasons of clarity, we only show the protein band corresponding to monomeric human MLC1, because the intensity of the band corresponding to dimeric MLC1 was lower. Cells from different controls showed variation in expression level, but this was not investigated further. (B) Left panel: fresh monocytes from an unrelated control (CTRL3) and from patient EL18 were isolated, extracts were obtained and processed by western blot. The band identified as MLC1 protein was absent in the EL18 patient. An unspecific band was visible in some monocyte extracts (asterisk). Right panel: immunohistochemical staining of MLC1 in control brain (A) and patient (EL18) tissue (B). In control tissue (A), the perivascular staining of MLC1 is visible (arrows), but no staining is observed in brain sections from the same patient (B). Cell nuclei are shown as dark circles. As a control of the integrity of the sections, GFAP had a normal staining and distribution in both control and MLC brain tissue (not shown). (C) Fresh monocytes from another unrelated control (CTRL4) and from three different MLC patients containing at least a *MLC1* missense mutation were isolated; extracts were obtained and processed by western blot. An unspecific band was visible in some monocyte extracts (asterisk). The band corresponding to monomeric MLC1 (specifically detected in human brain) was present in controls but not in monocytes from MLC patients. A loading control (translation factor eIF2 α) showed equal loading of total protein of the monocyte extract samples (not shown). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

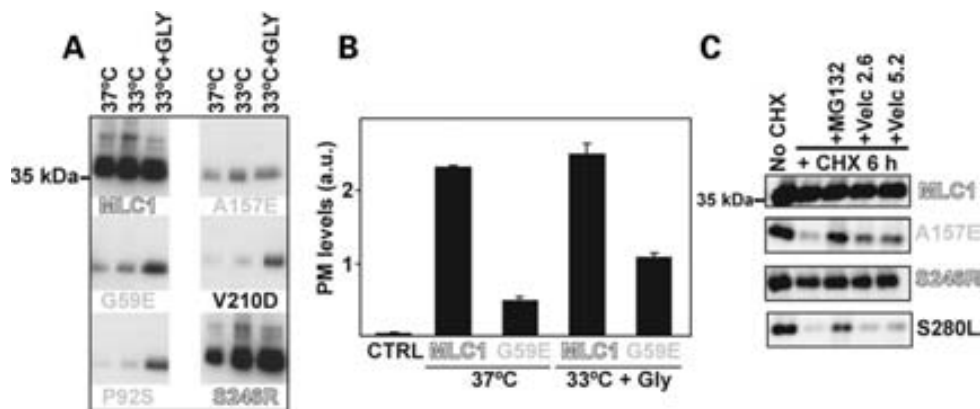


Figure 7. Chemical strategies to improve MLC1 mutants expression. (A) Transfected HeLa cells were incubated at 37°C, at 33°C or at 33°C with addition of 10 mM glycerol 24 h after transfection. Twenty-four hours later after glycerol addition, cells were harvested, solubilized and processed by western blot against the HA epitope. Two other independent experiments gave similar results. (B) PM analysis using a luminescence-based method in HeLa cells transfected with wt MLC1 or the G59E mutant after incubation at 33°C plus 10 mM glycerol. Data correspond to an independent experiment with four data points per construct, and are expressed in light arbitrary units (a.u.). Another independent experiment gave similar results. (C) Transfected HeLa cells with wt MLC1 or the mutants indicated containing HA tags were incubated or not 24 h after transfection with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 100 µg/ml) for 6 h plus the proteasomal inhibitor MG132 (50 µM) or the FDA-approved drug Velcade® (bortezomib) (Millennium Pharmaceuticals, Inc) at 2.6 and 5.4 µM. From three independent experiments, Velcade® (bortezomib) was able to recover protein expression about 25–40% for A157E and 5–15% for S280L mutants. β-Actin detection by western blot was used as a loading control (not shown). Mutant colour refers to the classification explained in Figure 1.

Chemical strategies to improve expression of MLC1 mutants

Finally, we decided to explore several experimental approaches that could improve mutant expression. First, we consider the possibility that incubation at low temperature or with chemical chaperones such as glycerol could raise mutant protein levels, as has been described in typical folding mutants of other proteins (36,37). In transfected HeLa cells, all the mutations studied, including the mild mutant S246R, increased steady-state values after lowering the temperature to 33°C and addition of glycerol (Fig. 7A). In one of the intermediate mutants, we studied [G59E, (38)], incubation of G59E-transfected HeLa cells at low temperature and with glycerol increased PM values concomitantly, whereas wt MLC1 surface levels were not significantly altered with this treatment (Fig. 7B).

As an another alternative approach, and because the expression of most mutants was increased after blocking proteasomal degradation (Fig. 4A), we explored the possibility of using FDA-approved proteasomal inhibitors like Velcade® (bortezomib) as a possible pharmacological approach in these patients (39). Our first aim was to check whether Velcade® (bortezomib) incubation could reduce mutant degradation after CHX treatment in transfected HeLa cells. As depicted in Figure 7C, Velcade® (bortezomib) partially reduced the degradation of the intermediate mutant A157E and the severe mutant S280L, with a higher efficiency for the intermediate mutant A157E. The house-keeping β-actin protein was used as a loading control.

DISCUSSION

The present study extends our knowledge on the molecular basis of the defect for mutations that do not disrupt completely the synthesis of full-length MLC1 protein.

Our data indicate that most MLC1 mutants are mainly retained in an intracellular compartment, probably the ER,

as evidenced by the studies with the chimeric protein containing glycosylation sites (MLC1GLYC). Although we do not know whether this chimera is functional, we believe that can be used to follow the intracellular trafficking of MLC1, because it is able to reach the PM and because the introduction of the mutations mirrors what happens in the protein without glycosylation sites. We hypothesized that the ER retention is a consequence of the misfolding caused by the mutations, as suggested by the recovery of protein expression by lowering the temperature or by adding chemical chaperones. Our previous studies indicated that MLC1 forms oligomers *in vivo* in the ER (17). Mutations could impede the correct oligomerization, which may be required for ER exit. Alternatively, mutations could simply disrupt protein structure.

This study also shows that mutants are also targeted to lysosomes after their internalization from the PM, as has been described for mutations in *CFTR* leading to cystic fibrosis (32). This observation supports the hypothesis that, apart from the ER quality control, there is a peripheral quality control mechanism regulating the conformation of PM proteins. We speculate that the proportion of degradation in proteasomes and lysosomes will vary depending on each particular mutation. A minor proportion of wt MLC1 protein is also targeted to lysosomes, probably as a consequence of the overexpression. In summary, we suggest that reduced PM levels are a consequence of increased protein degradation caused by an alteration of mutant protein trafficking.

We have classified the severity of the mutations on the basis of their impact on MLC1 PM protein levels. The lack of detailed clinical data for all the MLC patients limits possible correlations between this biochemical parameter and the phenotype of each patient. Possible genotype–phenotype correlations are also difficult to estimate due to the high intrafamilial phenotypic variability, the slow progression of the disease and the fact that the disease phenotype may worsen abruptly after minor head trauma or intercurrent infections (5). But, as a general impression, patients with truncated pro-

teins are not more severely affected than those patients with missense mutations. This phenotypic correlation can now be explained on the basis of our new data, because we provided evidence that MLC1 protein levels will be reduced in all cases.

Our study has also shown that the measured biochemical severity of each mutation depends on the cell system used to characterize the protein, as was neatly illustrated by the example of the S246R mutant. This mutant has roughly similar surface levels and protein stability to the wt MLC1 protein in *Xenopus* oocytes and transfected cell lines (Figs 1–4), although its protein levels are increased after reducing the temperature and adding glycerol (Fig. 7), which may indicate a minor folding problem. In contrast, surface expression and stability levels fell in primary cell culture of astrocytes (Fig. 5), and protein levels were not even detectable in monocytes from MLC patients harbouring this mutation (Fig. 6C). Possibly, the level of expression of the mutants in each cell system and the performance of the quality control machineries (ER and peripheral) determine the measured severity of each particular mutation.

Remarkably, most of the mutations studied led to attenuated cell surface expression of MLC1. There is an attractive parallelism in other genetic disorders, like cystinuria (40) or Bartter's syndrome (41). In these heterogeneous disorders that affect transport processes through the membrane, mutations that affect the catalytic subunit may affect surface expression or reduce functional activity, whereas mutations that affect the chaperone subunit cause only a reduction in surface expression. Given the hypothesis that the molecular cause of MLC is a defect in ion transport, and since there are still other unidentified MLC-causing genes, we speculate that MLC1 may function as a chaperone-like molecule of other proteins with ion transport activity.

We assumed that lack of expression will be a common feature for MLC patients with mutations in *MLC1*, based on our *in vitro* and *in vivo* data. In fact, in order to finally prove that this is a common defect, we should extend the *in vivo* study to more MLC patients with mutations in the *MLC1* gene. It will also be interesting to study MLC1 protein levels in MLC patients without linkage to the *MLC1* gene (15,16). Meanwhile, we suggest that this simple biochemical assay (Western blot from monocytes) could be used as an additional diagnosis tool.

Although the physiological pathway in which MLC1 operates is still unknown, the observation of a common defect for all the mutants indicates that therapeutic approaches directed at increasing the expression or stability of MLC1 could be beneficial in MLC patients with associated *MLC1* missense mutations. We have shown that the reduction of temperature, treatment with glycerol (this study) and curcumin (17) increased MLC1 expression levels. Furthermore, here we have addressed the effect of the first FDA approved drug that works as a proteasomal inhibitor (Velcade® (bortezomib)) (39), showing positive results in a transfected cell line model. If the mutants retain totally or partially their putative transport or chaperone function, a chemical based-therapy (42,43) could be used to treat MLC, although these results are very preliminary and further work with mouse models containing *MLC1* mutations is needed.

MATERIALS AND METHODS

Molecular biology

Constructs were made using recombinant PCR and were then sequenced. The construction of MLC1 with 2 *HA* tags has been described previously (17). To construct an MLC1 glycosylation reporter (MLC1GLYC), we introduced some amino acids from the extracellular loop of the highly glycosylated amino acid transporter LAT-4 (44) between the putative transmembrane domain 3 and 4 (before the MLC1 non-conserved intracellular loop). The amino acid sequence in this region was CKLVNMLKSE...AQDEMPSAIN (flanking residues of the LAT-4 inserted sequence in bold, residues 39 to 87).

Adenovirus production

Each wild-type or mutant (S246R) *MLC1* cDNA containing two *HA* epitope tags was amplified with two primers bearing attB1 and attB2 gateway recombination sites using *Pfu* Polymerase (Stratagene). PCR products were gel-purified and cloned into the pDONR221 vector using BP clonase (Invitrogen). Correct entry clones were identified by restriction analysis and fully sequenced. Each was recombined using LR clonase (Invitrogen) with the vector pAd/CMV/V5-DEST to construct a packageable vector plasmid. Adenoviruses were obtained according to the ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) protocol. Briefly, constructs were digested with *PacI* (New England Biolabs) and purified to expose the ITRs. HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Twelve hours later, the medium was removed and replaced with fresh DMEM (Biological Industries). Forty-eight hours post-transfection, cells were trypsinized and transferred to a sterile 10 cm tissue culture plate until 80% of visible regions with cytopathic effect were observed (10–13 days post-transfection). Cells and medium were collected to obtain the crude viral lysate. The transducing units per millilitre of each cell lysate were determined by α -hexon staining-based method (45).

Rat astrocytes primary culture, transfection and transduction

Purified rat astrocyte cultures were prepared from 1 to 3 days old Sprague Dawley rats (Charles River), as previously described with some modifications (46). Briefly, cerebral cortices were dissected and the meninges were carefully removed in cold sterile PBS 1x+0.3% BSA+0.6% glucose. The tissue was trypsinized for 10 min at 37°C and mechanically dissociated in complete DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Biological Industries), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% glutamine (Invitrogen) plus 40 U/ml DNase I (Sigma)) 10 times through a small bore fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was pelleted and resuspended in fresh complete DMEM, filtered through a 100 μ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm² cell culture flasks (TPP). When the mixed glial cells reached confluence, contaminating microglia, oligodendrocytes and precursor cells were dislodged by mechanical agitation and removed as previously

described (46). Astrocytes were then trypsinized, plated in poly-D-lysine-coated (Sigma) glass coverslipped in 24-well plates at about 80 000 cells/cm² and cultured for another 3–7 days. Cultured astrocytes were identified by their positive GFAP staining (a typical astrocyte marker, Dako). Their negative staining to class III β -tubulin (TUJ1, a neuronal marker (47), Covance) indicated the absence of neurons. These astrocytes expressed MLC1, as detected by western blot and immunofluorescence staining (data not shown).

Astrocytes were co-transfected with pCDNA3-wt MLC1 and mutants (G59E, A245P, S246R and S280L) together with PH-GFP, to visualize membrane staining (33). Astrocytes were plated on poly-D-lysine-coated (Sigma) glass coverslipped in 24-well plates (TPP) at 60% of confluence. The next day, astrocytes were transfected with lipofectin (Invitrogen) at 1:2 ratio (DNA:lipofectin) in Opti-MEM medium (as described in manufacturer's instructions) and after 3 h, medium was replaced with complete DMEM and incubated 48 h at 37°C. To infect astrocytes with adenovirus, they were then trypsinized and plated at 5·10⁵ cells on 35 cm plates. The next day, wt MLC1 or S246R mutant adenoviruses were added at a MOI of 2, and kept overnight at 37°C. Medium was then removed, new fresh medium was added and cells were incubated at 37°C until they were processed (24–48 h).

Immunological procedures

Immune sera against one human MLC1 synthetic peptide, corresponding to the first amino acids of the N terminal region of the protein (peptide: TQEPFREELAYDRMP), were raised in rabbits using the services provided by Eurogentec. The peptide was coupled to keyhole limpet haemocyanin via a cysteine residue that has been added to the C-terminal region, mimicking its N-terminal position. After three boosts of immunization, the antisera were affinity purified using the peptide covalently coupled to Sulpholink (Pierce). The polyclonal antibody was tested by immunoblotting, immunofluorescence and immunoprecipitation on transfected HeLa cells expressing human MLC1 and on non-transfected cells.

Transfected astrocytes were fixed for 15 min with 3% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS, incubated 10 min in PBS containing 50 mM ammonium chloride, 10 min in PBS containing 20 mM glycine and blocked and permeabilized for 2 h at RT with 10% FBS in PBS 0.1% Triton X-100. Subsequently, coverslips were incubated with primary antibody [anti-*HA* (3F10) at 1:500 (Roche) diluted in 10% FBS in PBS 0.1% Triton X-100] overnight at 4°C. After three washings, they were incubated with TRITC-conjugated donkey anti-rat (Jackson) in PBS 0.1% Triton X-100 at RT for 2 h. Finally, they were washed in PBS prior to mounting in Vectashield medium (Vector Laboratories) with DAPI (Sigma). Images were acquired using an Olympus DSU spinning disk confocal microscopy.

Measurement of surface expression by luminescence

HA antibodies (3F10, Roche) and chemiluminescence techniques were used to measure surface expression in MLC1-injected *Xenopus* oocytes, MLC1-transfected HeLa cells and MLC1-infected astrocytes, as previously described

(19). The mutant P294L (Fig. 1A) was studied only by measuring total protein expression levels, because this mutation disrupted the extracellular *HA* tag (see Materials and Methods).

Real-time PCR

MLC1 expression in one brain sample was compared to three lymphoblast cell lines (VU0046, VU0047 and VU0048). Duplicate samples were analysed. The quantitative PCR experiments were performed using an ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems). Transcript-specific primers were generated with Primer Express software (Applied Biosystems) and designed to bind exon–exon boundaries to prevent genomic DNA amplification. The PCR reaction was carried out in a volume of 10 μ l, using SYBR green PCR mix, 3.0 μ M primers and 0.1 μ g cDNA. The PCR program was applied following manufacturer's guidelines.

The cycle of threshold value (Ct) was used to calculate the relative expression level of MLC1 and was normalized to the transcripts for the housekeeping genes GADPH or β -actin. The Ct value is defined as the cycle number at which fluorescent emission reaches a fixed threshold during the exponential phase of amplification. The Ct value is inversely correlated with the original amount of mRNA. The resulting gene expression is given in Δ Ct, i.e. the mean Ct value corrected for a housekeeping gene.

Vesicular pH measurement of MLC1-containing endocytic organelles

The pH of endocytic vesicles containing MLC1 was measured by fluorescence ratio imaging of internalized anti-*HA* antibody (Covance) complexed with FITC-conjugated goat anti-mouse Fab antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Cells were incubated with the primary and secondary antibodies in tissue culture medium at 37°C for 1–3 h, antibodies were chased for 30 min in antibody free medium and then washed with NaKH medium (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Hepes, 10 mM glucose, 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, pH 7.3), and imaged on a microscope (Axiovert 100; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) at 35°C, equipped with a Hamamatsu ORCA-ER 1394 (Hamamatsu) cooled CCD camera and a 63 \times NA 1.4 Planachromat objective. Image acquisition and analysis were performed with MetaFluor[®] software (Molecular Devices). Images were acquired at 490 \pm 5 nm, and 440 \pm 10 nm excitation wavelengths, using a 535 \pm 25 nm emission filter. *In situ* calibration curves were obtained by clamping the vesicular pH between 4.5 and 7.0 in K⁺-rich medium (135 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM Hepes or 20 mM MES, 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂, containing 10 μ M nigericin, 10 μ M monensin, and 5 μ M carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazon) and recording the fluorescence ratio of cells loaded FITC-Fab and anti-*HA* antibody in MLC1 expressors. The fluorescence ratios as a function of extracellular pH provided the standard curve for the pH determination of MLC1-containing vesicles. In addition, one point calibration was done on each coverslip by clamping the vesicular pH to 6.5. Mono- and multi-peak Gaussian fits for vesicular pH were performed with Origin 7.0 software

(OriginLab® Corporation). The average pH of each type of vesicle population was calculated as the arithmetic mean of the data and was identical to the Gaussian mean, on the basis of single-peak distribution fitting, except for MLC1 and S246R and N141K mutants, in which two or three-peak Gaussian distribution analysis was performed.

Human brain tissue and human monocytes

A brain biopsy containing neocortex and subcortical white matter was obtained from a MLC patient (EL18) for diagnostic purposes (35); frozen tissue was used for the study. Although the mutations in this patient are not known, the family was informative and showed linkage to the *MLC1* locus. Quantitative real-time PCR analysis confirmed decreased *MLC1* expression in lymphoblasts of this patient (26). Frozen human control brain tissue specimens, consisting of neocortex and white matter, were obtained at autopsy from patients without neurological disease and neuropathologic abnormalities. During life, the patients or their next of kin had given consent for autopsy and the use of brain tissue for research purposes. Immunohistochemistry was performed with antibodies against the *MLC1* protein and GFAP (21).

Mononuclear cells were isolated from peripheral blood samples by centrifugation on a Ficoll-Hypaque (Seromed) gradient. Lymphocytes and monocytes were isolated by overnight attachment to a dish cell culture.

FUNDING

This study was supported in part by FIS PI04/1680 (R.E.), FIS PI04/1692 (V.N.), FIS PI04/2433 (A.M.), SAF2006-01631 (R.E.), Fundación Ramon Areces project (R.E.), ELA Foundation 2007-017C4 project (R.E.), BFU2004-01154 (F.A.). G.C.S., I.B. and M.S.v.d.K. are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (program grant 903-42-097, TOP grant 9120.6002), the Hersenstichting (grants 10F02(2).02, 13F05.04 and 15F07.30) and the Optimix Foundation for Scientific Research. G.L.L. was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), National Institutes of Health (NIH, NIDDK) and the Canadian Foundation for Innovation. G.L.L. is a holder of a Canada Research Chair. R.E. was a researcher from the *Programa Ramón y Cajal* of the Spanish Ministry of Science and Technology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elon Pras for providing us with lymphoblast cell lines from MLC patients; Ignacio Pascual-Castroviejo for blood from MLC patients; Soledad Alcántara, Miguel Morales and Xavier Gasull for help with primary astrocyte cultures; Joan Gil, Mercè de Frias and Felix Rueda for PBLs isolation; Artur Llobet for the gift of the PHGFP plasmid; Manel Cascalló for help with adenoviral production; Millennium Pharmaceuticals Inc. for the gift of Velcade® (bortezomib) and Michael Maudsley for editorial support.

Conflict of Interest statement. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Schiffmann, R. and Boespflug-Tanguy, O. (2001) An update on the leukodystrophies. *Curr. Opin. Neurol.*, **14**, 789–794.
- Schiffmann, R. and van der Knaap, M.S. (2004) The latest on leukodystrophies. *Curr. Opin. Neurol.*, **17**, 187–192.
- Goutieres, F., Bouloche, J., Bourgeois, M. and Aicardi, J. (1996) Leukoencephalopathy, megalencephaly, and mild clinical course. A recently individualized familial leukodystrophy. Report on five new cases. *J. Child Neurol.*, **11**, 439–444.
- Topcu, M., Saatci, I., Topcuoglu, M.A., Kose, G. and Kunak, B. (1998) Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Dev.*, **20**, 142–153.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F. and Valk, J. (1995) Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.*, **37**, 324–334.
- Singhal, B.S., Gursahani, R.D., Udani, V.P. and Biniwale, A.A. (1996) Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group. *Pediatr. Neurol.*, **14**, 291–296.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G. and Tortori Donati, P. (1995) Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology*, **37**, 679–686.
- Riel-Romero, R.M., Smith, C.D. and Pettigrew, A.L. (2005) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two siblings owing to two novel mutations: case reports and review of the literature. *J. Child Neurol.*, **20**, 230–234.
- Singhal, B.S., Gorospe, J.R. and Naidu, S. (2003) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *J. Child Neurol.*, **18**, 646–652.
- Pascual-Castroviejo, I., van der Knaap, M.S., Pronk, J.C., Garcia-Segura, J.M., Gutierrez-Molina, M. and Pascual-Pascual, S.I. (2005) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurologia*, **20**, 33–40.
- Saijo, H., Nakayama, H., Ezoe, T., Araki, K., Sone, S., Hamaguchi, H., Suzuki, H., Shiroma, N., Kanazawa, N., Tsujino, S. *et al.* (2003) A case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der knaap disease): molecular genetic study. *Brain Dev.*, **25**, 362–366.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B. *et al.* (2001) Mutations of *MLC1* (K1AA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 831–838.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C. and van der Knaap, M.S. (2002) Identification of novel mutations in *MLC1* responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.*, **110**, 279–283.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Ozcuc, M. and Seboun, E. (2000) Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 733–739.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S. and Kohler, W. (2003) Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics*, **34**, 215–218.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A. *et al.* (2003) Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology*, **61**, 534–537.
- Tejjido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M. and Estevez, R. (2004) Localization and functional analyses of the *MLC1* protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2581–2594.
- Meyer, J., Huberth, A., Ortega, G., Syagailo, Y.V., Jatzke, S., Mossner, R., Strom, T.M., Ulzheimer-Teuber, I., Stober, G., Schmitt, A. *et al.* (2001) A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is

- associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol. Psychiatry*, **6**, 302–306.
19. Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B. and Navon, R. (2004) Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **125B**, 31–37.
 20. Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A. and Estevez, R. (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 532–545.
 21. Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C. and van der Knaap, M.S. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412–419.
 22. Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R. and Lesch, K.P. (2003) The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia*, **44**, 283–295.
 23. Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T.C. and Aloisi, F. (2008) Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin–glycoprotein complex. *Mol. Cell. Neurosci.*, **37**, 480–493.
 24. Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J.C., van Horssen, J., Dinopoulos, A., Bove, K.E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F. *et al.* (2007) MLC1 is associated with the dystrophin–glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.*, **114**, 403–410.
 25. Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O. *et al.* (2006) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 292.
 26. Ijla Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C. and Pronk, J.C. (2006) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.*, **27**, 505–512.
 27. Gorospe, J.R. and Maletkovic, J. (2006) Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, **12**, 113–122.
 28. Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C. and Collins, F.S. (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in xenopus oocytes. *Science*, **254**, 1797–1799.
 29. Farinha, C.M., Penque, D., Roxo-Rosa, M., Lukacs, G., Dormer, R., McPherson, M., Pereira, M., Bot, A.G., Jorna, H., Willemsen, R. *et al.* (2004) Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J. Cyst. Fibros.*, **3** (Suppl. 2), 73–77.
 30. Laing, J.G., Tadros, P.N., Westphale, E.M. and Beyer, E.C. (1997) Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp. Cell Res.*, **236**, 482–492.
 31. Barriere, H., Nemes, C., Du, K. and Lukacs, G.L. (2007) Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3952–3965.
 32. Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K.G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H. *et al.* (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J. Cell Biol.*, **164**, 923–933.
 33. Halet, G. (2005) Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol. Cell.*, **97**, 501–518.
 34. Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K. and Tabata, S. (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. the coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res.*, **1**, 27–35.
 35. van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F. and Valk, J. (1996) Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.*, **92**, 206–212.
 36. Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S. and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones*, **1**, 117–125.
 37. Burrows, J.A., Willis, L.K. and Perlmutter, D.H. (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 1796–1801.
 38. Ben-Zeev, B., Levy-Nissenbaum, E., Lahat, H., Anikster, Y., Shinar, Y., Brand, N., Gross-Tzur, V., MacGregor, D., Sidi, R., Kleta, R. *et al.* (2002) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews. *Hum. Genet.*, **111**, 214–218.
 39. Bonuccelli, G., Sotgia, F., Capozza, F., Gazzo, E., Minetti, C. and Lisanti, M.P. (2007) Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell. Cycle*, **6**, 1242–1248.
 40. Chillaron, J., Estevez, R., Samarzija, I., Waldegger, S., Testar, X., Lang, F., Zorzano, A., Busch, A. and Palacin, M. (1997) An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9543–9549.
 41. Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F. and Jentsch, T.J. (2001) Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, **414**, 558–561.
 42. Cohen, F.E. and Kelly, J.W. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*, **426**, 905–909.
 43. Morello, J.P., Petaja-Repo, U.E., Bichet, D.G. and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 466–469.
 44. Bodoy, S., Martin, L., Zorzano, A., Palacin, M., Estevez, R. and Bertran, J. (2005) Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12002–12011.
 45. Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J.R. and Alemany, R. (2006) Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther.*, **13**, 696–705.
 46. McCarthy, K.D. and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.*, **85**, 890–902.
 47. Sergent-Tanguy, S., Chagneau, C., Neveu, I. and Naveilhan, P. (2003) Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J. Neurosci. Methods*, **129**, 73–79.

ANNEX 5.**Localization of MLC1 in astrocyte-astrocyte complex junctions is affected by changes of cell volume and the actin network**

Anna Duarri^{1,2,4}, Marisol Montolio^{1,2,4}, Tania López-Hernández^{1,2}, Xavier Capdevila^{1,2}, Lien Chu⁶, Margreet Ridder⁷, Tracy Hagenann⁸, Virginia Nunes^{1,3,5}, Albee Messing⁸, Darek Gorecki⁶, Marjo S. van der Knaap⁷, Albert Martínez^{9,*}, Raúl Estévez^{1,2,4,*}

¹CGMM-IDIBELL Gran Via s/n Km. 2,7 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

²Sección de Fisiología and ³Sección de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas II, IDIBELL-Universidad de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

CIBER de enfermedades raras (CIBERER), ⁴U-750; ⁵U-730; ISCIII

⁶School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth

⁷Department of Pediatrics/Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

⁸University of Wisconsin-Madison, USA

⁹Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Institute for Research in Biomedicine (IRB), Josep Samitier 1-5. Barcelona, E-08028, Spain

*Corresponding authors

E-mail: restevez@ub.edu (RE); albert.martinez@irbbarcelona.org

ABSTRACT

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) is a rare type of leukodystrophy, most often caused by mutations in the *MLC1* gene. Patients suffer from vacuolization of the myelin, which cause specific spectroscopic alterations as visualized by MRI. MLC1 protein is strongly expressed in astrocytes that surround brain barriers, although it is not completely clear whether it is located in endothelial-astrocyte or astrocyte-astrocyte contacts. Using astrocyte cultures, we established the cell culture conditions to visualize MLC1 in vitro as detected in tissue. It was clarified that MLC1 is located in complex junctions between astrocytes, which contain other proteins described typically in epithelial tight and adherent junctions, and that is not a member of the Dystrophin-Glycoprotein complex (DGC). Presence of MLC1 in these junctions needs the presence of stable cell-cell contacts, having neurons a positive effect on expression and localization. Specific co-immunoprecipitation was detected between MLC1 and Zonula Occludens 1 (ZO-1). Disrupting the actin cytoskeleton abolished MLC1 localization, but it was not altered in mouse models or human patients of Alexander disease affecting the astrocyte intermediate filament GFAP. MLC1 expression and localization is modified after a change in the extracellular osmolarity, in agreement with the putative role of MLC1 in water homeostasis. This study provides a new cell model closer to the situation detected in vivo, demonstrates the exact localization of MLC1 in astrocyte junctions and indicates for the first time a physiological process where the MLC1 protein is involved.

INTRODUCTION

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) (OMIM 604004) is a recently described leukodystrophy (van der Knaap et al., 1995). MLC is diagnosed by MRI; their distinct criteria are macrocephaly, swelling of the white matter and the presence of cysts mainly in the temporal region (van der Knaap et al., 1995). Biopsies from MLC patients showed that myelin was vacuolated (van der Knaap et al., 1996).

Genetics provided the first clue for this disease (Topcu et al., 2000). Mutations in the *MLC1* gene were identified in 80% of the MLC patients (Ilja Boor et al., 2006; Leegwater et al., 2001; Leegwater et al., 2002; Montagna et al., 2006), although other unknown genes are also involved (Blattner et al., 2003; Patrono et al., 2003). MLC1 is an oligomeric membrane protein with some degree of homology to ion channels (Leegwater et al., 2001; Teijido et al., 2004). Mutations found in MLC patients reduced MLC1 protein expression at the plasma membrane (Duarri et al., 2008).

In brain, MLC1 is located in two neural populations: neurons and glial cells (Boor et al., 2005; Schmitt et al., 2003; Teijido et al., 2004; Teijido et al., 2007). In glial cells, MLC1 is mainly present close to brain barriers surrounding extracellular spaces. This cellular localization lead to the hypothesis that MLC1 could be located in the same membrane with aquaporin-4 (AQP4) and Kir4.1 channels, which are involved in water and potassium siphoning (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003). These proteins are present in the astrocyte membrane in direct contact with endothelial cells having direct interaction with proteins of the Dystrophin-Glycoprotein Complex (DGC) (Amiry-Moghaddam et al., 2004). In this sense, using immunofluorescence and biochemical studies in human tissue and in rat astrocyte primary cultures, it has been indicated that MLC1 also interacts with the DGC complex (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007). In contrast, we indicated that in mouse tissue, using electron microscopy studies, MLC1 was located in astrocyte-astrocyte membranes but not in astrocyte-endothelial junctions (Teijido et al., 2007). Here, we tried

to clarify whether MLC1 forms part of the DGC complex and to understand in which class of junctions is MLC1 located.

There is not any clear physiological role of MLC1. Based on the vacuolization present in MLC patients, the low homology of MLC1 to ion channels and the localization in astrocyte surrounding brain barriers, it has been suggested that MLC1 could have a putative role in ion transport processes linked to water movements. Unfortunately, functional evidence is lacking, because no ion channel activity has been detected after expression of MLC1 in heterologous systems (Kaganovich et al., 2004; Teijido et al., 2004). Here, we provide new evidences that MLC1 function is linked to the control of water homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Immunological procedures

Immune sera against N-terminal mouse MLC1 antibodies and the N4 human MLC1 antibody were generated and characterized previously (Duarri et al., 2008; Teijido et al., 2004; Teijido et al., 2007). Immune sera (N5 human antibody) against another human MLC1 synthetic peptide, corresponding to amino acids 26-40 of the N-terminal region of the protein (peptide: ASYAPDAKPSDLQLS) were raised in rabbits using the services provided by Eurogentec. The peptide was coupled to keyhole limpet hemocyanin via a cysteine residue that has been added to the C-terminal end of the peptide, mimicking its N-terminal position. After three boosts of immunization, the antisera were affinity purified using the peptide covalently coupled to Sulfolink (Pierce). The polyclonal antibody was tested by immunoblotting, immunofluorescence and immunoprecipitation on transfected HeLa cells expressing human MLC1 and on tissue.

Primary culture and adenoviral transduction

Animals were handled in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and all protocols were approved by the national committee. Rat and mouse primary astrocyte and were prepared as described previously with some modifications (McCarthy and de Vellis, 1980; Duarri et al., 2008). Briefly, cortex and hippocampus were removed from newborn Sprague Dawley rats or mice. Rat astrocyte cultures were prepared from 1 to 3 days old Sprague Dawley rats and mice astrocyte cultures were prepared from forebrain O to 1 day old OF1 mice (Charles River). Cerebral cortices were dissected and the meninges were carefully removed in cold sterile 0.3% BSA, 0.6% glucose in PBS. The tissue was trypsinized for 10 min at 37°C and mechanically dissociated in complete DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Biological Industries), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% glutamine (Invitrogen) plus 40 U/ml DNase I (Sigma)) through a small bore fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was pelleted and resuspended in fresh complete DMEM, filtered through a 100- μ m nylon membrane (BD Falcon) and plated into 75 cm² cell culture flasks (TPP). When the mixed glial cells reached confluence, contaminating microglia, oligodendrocytes and precursor cells were dislodged by mechanical agitation and removed as previously described (McCarthy and de Vellis, 1980). Astrocytes were plated in 6-wells plates, at density of 4·10⁵ cells per well, or in poly-D-lysine-coated coverslips at 7,5·10⁴ cells per 24-well plate. Medium was changed every 3 days. In order to obtain astrocyte cultures arrested in the cell cycle, medium was replaced and cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) (2 μ M) was added to prevent their proliferation. Cultured astrocytes were identified by their positive GFAP staining (a typical astrocyte marker, Dako). Construction of adenovirus expressing HA-tagged human MLC1 and transduction of astrocytes was already described (Duarri et al., 2008).

For the hippocampal co-cultures of astrocytes and neurons, we dissected and processed hippocampus from P0/P1 rat pups. Cells were seeded in poly-L-lysine-coated (Sigma) 6-well plates at 3·10⁵ cells/plate or 24-wells coverslips at 2·10⁴ cells/well in Neurobasal medium supplemented with 1x B27 supplement, penicillin/streptomycin 1%, L-glutamine 1% and 290 μ l NaHCO₃ 7,5% (Gibco). Medium was replaced after 4 days and at this point, AraC was added to prevent astrocyte proliferation.

Immunofluorescence studies

Tissue immunohistochemistry was performed as previously described (Teijido et al., 2004; Teijido et al., 2007).

For immunofluorescence staining of cells, they were fixed with PBS containing 3% paraformaldehyde for 15 min, blocked and permeabilized with 10% FBS and 0,1% Triton X-100 in PBS for 2h at room temperature (RT). Primary antibodies were diluted in the same solution and incubated over-night at 4°C. Rabbit anti-mouse MLC1 and anti-human MLC1 (1:50), mouse anti-ZO-1 (1:100; Zymed), anti-N-Cadherin (1:100; Sigma), anti- β -Catenin (1:100; BD Transduction Lab.), anti-Occludin (1:100; Zymed), anti-Ezrin

(1:200; Abcam), anti-vinculin (1:1000; Zymed), anti-Connexin 43 (1:50; Zymed), Phalloidin-FITC (1:1000; Sigma), anti- β -Tubulin (1:1000; Chemicon), anti-GFAP (1:2000; Chemicon), anti-HA 3F10 (1:500; Roche), anti- β -Dystroglycan (1:100; Novacastra), anti- α -Dystroglycan (1:30; Upstate), anti-Syntrophin (1:80; Affinity Bioreagents), anti- β -Dystrobrevin (1:200). Cells were washed and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies: Alexa-488 goat anti-mouse, Alexa-568 goat anti-rabbit, Alexa-568 goat anti-mouse and Alexa-488 goat anti-rabbit (1:500 dilution; Invitrogen). Coverslips were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) with 1.5 μ g/ml DAPI (Sigma) and visualized using an Olympus DSU spinning disk confocal. Colocalization experiments were performed using ImageJ.

Co-immunoprecipitation and Western-blot

Rat brains were homogenised in immunoprecipitation buffer: 150 mM NaCl in PBS containing 1% DDM and protease inhibitors: 1 μ M Pepstatin and Leupeptin, 1 mM Aprotinin and PMSF using a dounce homogenizer. Tissue lysates were incubated for 1 h at 4°C and centrifuged to discard large debris, and proteins were quantified by the BCA kit (Pierce). Antibodies against mouse MLC1, an irrelevant IgG or BSA were covalently linked in an agarose matrix as described in the AminoLink Plus Immobilization Kit (Pierce) instructions. Antibody linked agarose matrix was equilibrated in immunoprecipitation buffer and tissue lysate was added in a ratio of 10 μ l:100 μ g of protein and incubated 2 h at 4°C. Flowthrough was recuperated by centrifugation and pellet was washed in the same buffer. Immunoprecipitates were eluted in SDS loading sample buffer for 15 min at 60°C.

For Western blot studies, astrocyte lysates were prepared by homogenization of cell in PBS containing 1% Triton X-100 and proteases inhibitors: 1 μ M Pepstatin and Leupeptin, 1 mM Aprotinin and PMSF, incubated for 1 h at 4°C and centrifuged. Supernatant were quantified using BCA kit (Pierce) and supplied with SDS loading sample buffer. Western-blot analysis was performed as described (Teijido et al., 2004). Membranes were incubated with primary antibodies: rabbit anti-MLC1 (1:100) and mouse anti- β -Actin (1:10000) and secondary antibodies: HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit (1:10000; Jackson). Quantification of Western blots was performed by ImageJ.

Electron microscopy

Naval Medical Research Institute (NMRI) adult mice (n=2) were perfused with 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer. Brains were removed and small samples of hippocampus, cortex and cerebellum were dissected, cryoprotected gradually in sacarose and cryofixed by immersion in liquid propane. Freeze substitution was performed at -90 °C during 3 days in an "Automatic Freeze Substitution System" (AFS, Leica), using methanol containing 0.5% uranyl acetate as substitution medium. Infiltration was carried out in Lowicryl HM20 at -50 °C and then polymerized with UV lamps. Small human cerebellum samples were obtained post-mortem (Hospital de Bellvitge), fixed in 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer and processed as above. Ultrathin sections were collected and processed for a post-embedding immunostaining. Mouse samples were incubated with rabbit anti-N-terminal MLC1 (1:10) and mouse anti-ZO-1 (1:10) antiserum and, later, with 18 nm gold-conjugated goat anti-rabbit (British Biocell International; 1:20) and 12 nm colloidal gold-coated goat anti-mouse (British Biocell International; 1:20) secondary antibodies. Human samples were incubated with rabbit anti-N4-human MLC1 (1:10) or anti-N5-human MLC1 (1:10) antiserum. For double immunostaining, grids were incubated with rabbit anti-N4-human MLC1 (1:10) and mouse anti-ZO-1 (1:10) or mouse anti-occludin (1:10) antisera. The secondary antibodies were the same as for mouse samples. In control experiments, the primary antibodies were omitted. No immunogold labeling occurred under these conditions.

RESULTS

Expression of MLC1 in primary astrocyte cultures

Previous studies from our group identified MLC1 localization in astrocyte-astrocyte contact regions in Bergmann glia and astrocytes surrounding blood vessels (Teijido et al. 2007). We aimed to establish a cellular model to study MLC1 physiology and cell biology. First, astrocytes were isolated from different brain regions (see Material and Methods), and MLC1 expression was studied by Western blot after several weeks in culture (Figure 1A, left). MLC1 expression increases in older astrocyte cultures, and was higher in astrocytes derived from brain hippocampus.

Next, immunostainings of MLC1 in astrocytes derived from hippocampus after 3 weeks in culture were performed. Studies were done in parallel in astrocyte cultures at low (LD) (Figure 1B) and high density (HD) (Figure 1C). Unexpectedly, endogenous MLC1 was not detected at the plasma membrane, as occur

with MLC1 expressed in heterologous systems (Boor et al., 2005; Teijido et al., 2004). Instead, MLC1 was present in a diffuse intracellular location through the whole cytoplasm. Increased antibody signal was detected in astrocyte high density cultures (Figure 1C).

Due to the fact that we detected in tissue to MLC1 in junctions, and junctional proteins are mainly present when cells are in a quiescent state, we applied to astrocyte cultures different compounds that block cell proliferation and/or cause cell differentiation as cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC), Fluoridine/uridine and dibutyryl-cyclic AMP. Subsequent immunostaining studies were performed after drug application at several time points. Interestingly, in the presence of these compounds, MLC1 localization began to appear at the plasma membrane after 1 week in culture, and it was clearly detected in astrocyte junctions after 3 weeks in culture (we indicate here the results for AraC in Figures 1D and 1E, respectively). In the presence of these compounds, expression of MLC1 also increased in older cultures (Figure 1A, right). Intracellular signal was also reduced after longer time in culture. Similar results were found in mouse astrocyte cultures (Supplementary Figure 1A).

It has been shown that neurons promoted an increased expression of junctional proteins in cultures, such as connexin 43 or connexin 30 (Koulakoff et al., 2008; Rouach et al., 2000). In this sense, MLC1 expression (Figure 1A, right) and localization (Figures 1F-G) were studied in mixed cultures of neurons and astrocytes at different culture times (Material and Methods). Similarly to these gap junction proteins, in the presence of neurons, MLC1 astrocyte expression increased earlier (Figure 1F), and was located also sooner in longer astrocyte processes between neighbouring astrocytes (Figure 1G), with reduced expression in intracellular vesicles.

In these mixed cultures, at higher densities, MLC1 was detected surrounding the whole membrane within neighbouring astrocytes (Figure 3H). Interestingly, at low densities, in isolated astrocytes, MLC1 was mostly detected intracellularly and only a minor proportion was visible at the plasma membrane, but present in contact regions within the same cell (Figure 3I, arrow). This result indicated that MLC1 localization in astrocyte junctions is clearly dependent on cell-cell contacts and the presence of a resting state.

Colocalization between MLC1 and junction-related proteins in astrocyte cultures

In order to clarify in what type of junctions MLC1 was located, we performed double immunofluorescence studies in astrocytes using different protein markers related with junctions/adhesion.

Thus, a high degree of colocalization between MLC1 and components of tight junctions such as zonula occludens 1 (ZO-1) (Fanning and Anderson, 2009) (Figure 2A) or occludin (Hirase et al., 1997) (Figure 2B) was observed. Similarly, there was a high degree of colocalization with components of adherent junctions, such as β -Catenin (Perego et al., 2002) (Figure 2C) and N-Cadherin (Tran et al., 2008) (Figure 2D), being more pronounced in high density cultures for the latter.

Connexin 43 (Cx-43), a typical component of astrocytic gap junctions (Rouach et al., 2000) colocalized partially with MLC1 (Figure 2E). Whereas MLC1 was completely distributed along the membrane protrusion joining two cells, Cx43 was localized in discrete spots through the membrane protrusion. Vinculin, a typical marker of focal adhesions (Kalman and Szabo, 2001) (Figure 2F) and Ezrin, a protein located in developing astrocyte processes (Derouiche and Frotscher, 2001), did not colocalize with MLC1 (Figure 2G). Similar results of colocalization were observed in mouse astrocytes for β -Catenin and ZO-1 (Supplementary Figure 1B and 1C, respectively).

As an additional proof of the localization of MLC1, astrocytes were infected with adenoviruses expressing HA-tagged human MLC1. Localization of the HA antibody signal was clearly visible in astrocyte processes, colocalizing with β -Catenin (Supplementary Figure 2).

Colocalization between junction-related proteins and MLC1 in tissue

Previous results from our group (Tejido et al., 2007), using the higher resolutive method of electron microscopy post-embedding immunostaining in mouse, detected MLC1 expression only in protoplasmatic and perivascular astrocyte-astrocyte junctions, but not in endothelial-astrocyte junctions. To extend the results from the astrocyte culture to mouse tissue, double EM immunostainings were performed using some of the markers detected in the rat astrocyte culture (ZO-1 for Figures 3A and 3B). Colocalization between MLC1 and these junction proteins was detected in electron dense areas within astrocytes.

To exclude that MLC1 localization could differ between humans and mice, similar studies using human tissue were done (Figures 3C-3H). The experiments were realized using two new rabbit polyclonal antibodies against human MLC1 protein (anti-N4 human and anti-N5 human MLC1 antibody, see Material and Methods). The N4 antibody (Duarri et al., 2008) didn't give an antibody signal in brains from MLC patients, indicating that it is highly specific. Both antibodies gave similar staining results (Figure 3C and Figure 3D for the N4 and the N5 antibodies, respectively). Gold particles were mainly detected in higher electron density contact regions between astrocytes, but not between astrocytes and endothelial cells, indicating that, as in mouse, human MLC1 is not detected in the perivascular junction.

Similar to mouse tissue, it was detected in human tissue that ZO-1 (Figure 3E and 3F) and occludin (Figure 3G and 3H) colocalized with MLC1 in these astrocyte-astrocyte junctions. The specificity of the antibodies against junction proteins was demonstrated because they detected the corresponding proteins in junctions between epithelial cells (Fanning and Anderson, 2009) (see inset of Figure 3E for ZO-1 and arrows in Figure 3G for occludin).

Then, we concluded that MLC1 is localized in astrocyte-astrocyte junctions, and that these junctions are formed by protein components typically present in epithelial adherent and tight junctions.

Co-immunoprecipitation of MLC1 with ZO-1

The protein zonula occludens 1 (ZO-1) is a member of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) homologue family of proteins (Fanning and Anderson, 2009). ZO proteins function as a regulated scaffold for tight junction proteins due to its ability to bind to the cortical actin cytoskeleton. Furthermore, it has been described that ZO proteins promote cadherin-mediated cell-cell adhesion (Fanning and Anderson, 2009).

We reasoned that localization of MLC1 in these astrocytic complex junctions could also depend on interaction with ZO-1. In this sense, co-immunoprecipitation experiments were performed using MLC1 antibody coupled-beads (Figure 4A). Immunoprecipitation of MLC1 was highly efficient and specific, as nearly no MLC1 was detected in the non-bound fraction of the immunoprecipitation, and no MLC1 protein was detected in the immunoprecipitate of an unrelated IgG (Figure 4A). In the MLC1 immunoprecipitate, a specific higher molecular weight protein band detected by the antibody directed against ZO-1 was also copurified (Figure 4B). Similar results were found using other MLC1 antibodies (data not shown)

MLC1 is not related with the DGC complex

These new results are not in agreement with previous reports which indicated that MLC1 was located in astrocyte-endothelial junctions, being anchored to these contact regions through interaction with proteins from the DGC complex (see Introduction). Taking these new studies into account, we decided to explore this issue in more detail.

It has been shown that the anchorage of some astrocytic proteins, such as AQP4 or Kir4.1 channels, in the membrane apposed to pial or perivascular basal laminae, depends on the DGC complex (Amiry-Moghaddam et al., 2004). Hence the study of MLC1 localization in mice carrying targeted gene deletions affecting the DGC (Haenggi and Fritschy, 2006; Rees et al., 2007) might clarify whether MLC1 localization depends on the integrity of the DGC complex, as already been shown for AQP4 (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003). Initially, confocal analysis of MLC1 expressions were performed in various dystrophic mouse brains (Haenggi and Fritschy, 2006; Moukhles and Carbonetto, 2001; Rees et al., 2007), including wild-type (Figure 5A), utrophin KO (Figure 5B), dystrophin KO (mdx mouse) (Figure 5C) and α -dystrobrevin KO mice (Figure 5D). No change in MLC1 expression was found in any of the dystrophic brain capillaries. In contrast, staining of α -dystrobrevin was lost in the mdx mouse, confirming the disappearance of the α -dystrobrevin containing DGC complexes. To further confirm this observation, immunohistochemistry studies were performed in other KO mice models related directly or indirectly with the DGC complex, including AQP4, merosin and syntrophin KO mice (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Bragg et al., 2006). In these others KO mice models localization of MLC1 was neither reduced or altered (Supplementary figure 3).

To detect whether could exist differences in localization between mice and human, we performed double EM immunostainings in human tissue using antibodies directed against human MLC1 and β -dystroglycan (Figure 5E). As already described (Haenggi and Fritschy, 2006), small gold particles corresponding to β -dystroglycan signal were detected in astrocyte membranes contacting basal laminae. In contrast, bigger size gold particles, corresponding to MLC1 protein, were not present in that membrane, and were located in junctions between astrocytes.

Furthermore, coimmunoprecipitation experiments were also performed. In the MLC1 immunoprecipitate, no antibody signals corresponding to Syntrophin, α -Dystroglycan, β -Dystrobrevin and β -Dystroglycan were detected (Figure 5F)

Finally, we decided to study additionally the localization of some proteins related with the DGC complex in growing and quiescent astrocytes in culture. α -Dystroglycan was detected at the plasma membrane in a patchy pattern and with an intracellular localization in growing astrocytes (Figure 5G), but it was located only in an intracellular localization in quiescent astrocytes (Figure 5H). In both cases, the colocalization with MLC1 was minor, and only some colocalization was observed within intracellular compartments. Similar results were found for syntrophin and β -dystrobrevin (data not shown).

Relationship between MLC1 localization and the cytoskeleton

Once established that the localization of MLC1 was not dependent on the integrity of the DGC complex, we addressed whether the cytoskeleton could play a role. Our experimental approach to address the role of the cytoskeleton was based first, in performing double immunostaining experiments between MLC1 and typical protein markers of each type of cytoskeletal element, and second, perturb specifically each type of network filaments with the use of inhibitors. In the case of astrocyte intermediate filaments, formed by glial fibrillary acid protein (GFAP), MLC1 localization in animal models of Alexander disease (Hagemann et

al., 2009) or in the human brain from an Alexander disease patient were studied. We reasoned that this study could also provide keys about the pathophysiology of Alexander disease.

As observed in Figure 6A, actin filaments stained with phalloidin were present in MLC1 positive astrocyte junctions. Disruption of the actin network completely abolished MLC1 localization in junctions (Figure 6D). In clear contrast, microtubules, detected with β -tubulin, were not present in MLC1 positive junctions (Figure 6B), neither MLC1 localization was changed after microtubule disruption (Figure 6E) or microtubule stabilization (Figure 6F). For intermediate filaments, some colocalization within the astrocyte junctions between MLC1 and GFAP was detected (Figure 6C). In contrast, MLC1 localization was not altered in comparing a wild-type mouse with a mouse model of Alexander disease (Figures 6G and 6H, respectively). MLC1 localization was also not altered in a human brain from a patient with Alexander disease (*de novo* c.1246C>T / p.Arg416Trp mutation in GFAP) (Figure 6I). These results suggested that MLC1 localization was mostly dependent on an intact actin filament network.

Localization of MLC1 in junctions depends on the extracellular osmolarity

It has been suggested that MLC1 could have a role in water homeostasis, due to its presence close to brain barriers and the vacuolating phenotype present in the white matter of MLC patients (van der Knaap et al., 1996). Thus, we decided first to experimentally address whether treating the cells with a hypoosmotic medium would alter MLC1 localization or expression.

Primary culture of rat astrocytes were treated for 24 hours with a physiological medium (300 mOsm) or with a hypotonic medium (170 mOsm), then fixed and assayed for localization of MLC1 and beta-catenin proteins, as a markers of junctions.

As depicted in Figures 7A-B, treatment during 24 hours with a physiological or with a hypotonic solution preserved most of the β -catenin protein localization in junctions. In contrast, after 24 hours in the presence of a hypoosmotic medium, most of the MLC1 protein was located intracellularly (Figures 7C-7D). Interestingly, when observing at high magnification MLC1 localization in hypoosmotically treated cells, it was found to surround vacuole-like structures.

Finally, we also investigated whether the osmolarity of the medium influenced MLC1 protein levels. After 24 hours, MLC1 protein levels were reduced to $60 \pm 3 \%$ (N = 3 independent experiments) in hypoosmotic conditions, whereas no change was observed in physiological or hyperosmotic conditions. Actin was used as an internal control.

DISCUSSION

The present study extends our knowledge on the detailed description of MLC1 localization in astrocytes, providing the first clue about its physiological role.

Our results in rat and mouse astrocytes indicated that MLC1 expression at the plasma membrane depends on the formation of stable cell-cell contacts, as neatly illustrated in isolated cells. Furthermore, similar to what occurred for other junction proteins as Connexin 43 (Rouach et al., 2000), the presence of neurons increased the expression and the amount of MLC1 in junctions.

What is the nature of these junctions? Colocalization experiments between MLC1 and other proteins located in junctions indicated that these junctions have components typically described in tight (occludin, ZO-1) and adherent junctions (N-cadherin, β -catenin). So, in agreement with other authors (Mack and Wolburg, 2006; Wolburg et al., 1983; Wolburg et al., 2009), we suggest to name them as complex junctions. At the

electron microscopy level in human and mouse, these junctions show a high electron density, suggesting a very high concentration of proteins. Our results of co-immunoprecipitation and colocalization experiments lead to suggest that anchoring of MLC1 to these junctions depends on an interaction with the adaptor molecule ZO-1, that should also be linked to the actin cytoskeleton.

In a way similar to these studies, a previous study (Duffy et al., 2000), reported that human foetal astrocytes express the typical tight junction (TJ) molecule Claudin 1 after treatment with Interleukin-1-beta (IL-1 β), forming another type of junctions that were named by the authors as TJ-like structures. Treatment of rat or mouse astrocytes with IL-1 β did not induce Claudin 1 expression and did not cause any change in MLC1 expression or localization (data not shown), suggesting that other factors are necessary for proper Claudin 1 expression in these species. Are these junctions able to form a barrier for the flux of molecules? Several studies indicated that astrocytes do not contribute *per se* to blood brain barrier properties (Wachtel et al., 2001). Further studies are needed to address this question in the cell model described here.

Why there are differences between our results and previous results from other groups in the localization of MLC1 (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007)? First studies suggesting that MLC1 was located in the DGC complex were based on colocalization analysis at the confocal level (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2007; Boor et al., 2005; Tejjido et al., 2004). Due to the close distance between different membranes in the end-feet, this method appear to be not suitable, and a most resolutive one such as electron immunogold immunocytochemistry is mandatory (Tejjido et al., 2007). Other experiments performed localization studies of DGC-related proteins in brain tissue from MLC patients (Boor et al., 2007). In these studies, no change in localization was observed for Merosin, β -dystroglycan and Aquaporin-4. Only Kir4.1 showed an additional diffuse cytoplasmatic staining and misexpression of Agrin and α -Dystroglycan were observed in neurons (Boor et al., 2007). We interpret that these changes in Kir4.1, agrin and α -dystroglycan expression were possibly due to the MLC disease phenotype. Finally, other experiments were based on biochemical fractionation and colocalization studies in growing astrocytes (Ambrosini et al., 2008). Although we also observed some degree of colocalization, we reasoned that it does not have physiological relevance, because the localization of MLC1 in tissue is different from what has been found in growing astrocytes. Taking together, our experiments indicate that MLC1 is not a member of the DGC complex.

Localization of MLC1 in these junctions depends on an intact actin network and not on an intact microtubule network, as showed with the experiments using cytoskeletal filaments disrupting drugs. MLC and Alexander disease are two types of leukodystrophies where astrocytes are affected and that share some phenotypes (Gorospe and Maletkovic, 2006). It was logical to address whether MLC1 localization could be altered in Alexander disease models. Our results indicate that MLC1 localization is not altered in these models, suggesting that MLC1 dislocalization does not contribute to Alexander disease phenotype.

In agreement with the suggested role of MLC1 in water homeostasis, MLC1 localization changes due to cell swelling caused by a hypoosmotic treatment from a surface localization in cell junctions to the membrane of intracellular vacuoles. Although the exact nature of the observed vacuoles needs to be defined, possibly, these vacuoles could contain water inside. Perhaps MLC1 could have a role in the transport of water inside these vacuoles. MLC1 protein levels were also influenced by the hypoosmolarity of the medium. Whether these expression changes are due to modified transcription or protein stability need further experimentation. It is also interesting here to note that MLC1 localization was dependent on the actin cytoskeleton and the actin network is key to cope with changes of cell volume (Pasantes-Morales et al., 2006).

In summary, this work clarifies the exact localization of MLC1 in astrocytes and indicates that MLC1 localization is influenced by changes in cell cycle, cell-cell connection, the actin network and the extracellular osmolarity. The astrocyte culture described here constitutes a starting cell model to study the molecular basis of MLC, and in general, the role of MLC1 in water homeostasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Miguel Morales and Xavier Gasull for initial help with primary astrocyte cultures, Logopharm GmbH for initial proteomic studies and Elena Ambrosini for the gift of different antibodies against DGC proteins.

Conflict of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This study was supported in part by SAF2006-01631 (RE), Fundación Ramon Areces project (RE), ELA Foundation 2007-017C4 project (RE and MSvdK), BFU2006-14600-CO2-O2 (VN), CIBERER INTRA750 (RE and VN). MSvdK are supported by the Dutch Organization for Scientific Research ZonMw (program grant 903-42-097, TOP grant 9120.6002), the Hersenstichting (grants 10F02(2).02, 13F05.04 and 15F07.30) and the Optimix Foundation for Scientific Research.

REFERENCES

- Ambrosini, E., Serafini, B., Lanciotti, A., Tosini, F., Scialpi, F., Psaila, R., Raggi, C., Di Girolamo, F., Petrucci, T.C., and Aloisi, F. (2008). Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 480-493.
- Amiry-Moghaddam, M., Frydenlund, D.S., and Ottersen, O.P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129, 999-1010.
- Amiry-Moghaddam, M., and Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 991-1001.
- Blattner, R., Von Moers, A., Leegwater, P.A., Hanefeld, F.A., Van Der Knaap, M.S., and Kohler, W. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *Neuropediatrics* 34, 215-218.
- Boor, I., Nagtegaal, M., Kamphorst, W., van der Valk, P., Pronk, J.C., van Horssen, J., Dinopoulos, A., Bove, K.E., Pascual-Castroviejo, I., Muntoni, F., *et al.* (2007). MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol.* 114, 403-410.
- Boor, P.K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C.B., Powers, J.M., Pronk, J.C., Scheper, G.C., and van der Knaap, M.S. (2005). MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 412-419.
- Bragg, A.D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (2006). Assembly of a perivascular astrocyte protein scaffold at the mammalian blood-brain barrier is dependent on alpha-syntrophin. *Glia* 53, 879-890.
- Derouiche, A., and Frotscher, M. (2001). Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330-341.
- Duarri, A., Teijido, O., Lopez-Hernandez, T., Scheper, G.C., Barriere, H., Boor, I., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Martinez, A., *et al.* (2008). Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3728-3739.

- Duffy, H.S., John, G.R., Lee, S.C., Brosnan, C.F., and Spray, D.C. (2000). Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 20, RC114.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 113-120.
- Gorospe, J.R., and Maletkovic, J. (2006). Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 12, 113-122.
- Haenggi, T., and Fritschy, J.M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1614-1631.
- Hagemann, T.L., Boelens, W.C., Wawrousek, E.F., and Messing, A. (2009). Suppression of GFAP toxicity by alphaB-crystallin in mouse models of Alexander disease. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1190-1199.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 14), 1603-1613.
- Ilja Boor, P.K., de Groot, K., Mejaski-Bosnjak, V., Brenner, C., van der Knaap, M.S., Scheper, G.C., and Pronk, J.C. (2006). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 505-512.
- Kaganovich, M., Peretz, A., Ritsner, M., Bening Abu-Shach, U., Attali, B., and Navon, R. (2004). Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 125B, 31-37.
- Kalman, M., and Szabo, A. (2001). Immunohistochemical investigation of actin-anchoring proteins vinculin, talin and paxillin in rat brain following lesion: a moderate reaction, confined to the astroglia of brain tracts. *Exp. Brain Res.* 139, 426-434.
- Koulakoff, A., Ezan, P., and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299-1311.
- Leegwater, P.A., Boor, P.K., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Visser, A., Konst, A.A., Oudejans, C.B., Schutgens, R.B., Pronk, J.C., and van der Knaap, M.S. (2002). Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Genet.* 110, 279-283.
- Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., *et al.* (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 831-838.
- Mack, A.F., and Wolburg, H. (2006). Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Res.* 1103, 25-31.
- McCarthy, K.D., and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-902.
- Montagna, G., Teijido, O., Eymard-Pierre, E., Muraki, K., Cohen, B., Loizzo, A., Grosso, P., Tedeschi, G., Palacin, M., Boespflug-Tanguy, O., *et al.* (2006). Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum. Mutat.* 27, 292.
- Moukhles, H., and Carbonetto, S. (2001). Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J. Neurochem.* 78, 824-834.
- Pasantés-Morales, H., Lezama, R.A., Ramos-Mandujano, G., and Tuz, K.L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am. J. Med.* 119, S4-11.
- Patrono, C., Di Giacinto, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Rodriguez, D., De Stefano, N., Federico, A., Gatti, R., Benigno, V., Megarbane, A., *et al.* (2003). Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 61, 534-537.

- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M.G., Francolini, M., Vicentini, L.M., and Pietrini, G. (2002). Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell. Sci.* 115, 3331-3340.
- Rees, M.L., Lien, C.F., and Gorecki, D.C. (2007). Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. *Neuromuscul. Disord.* 17, 123-134.
- Rouach, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell Biol.* 149, 1513-1526.
- Schmitt, A., Gofferje, V., Weber, M., Meyer, J., Mossner, R., and Lesch, K.P. (2003). The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia* 44, 283-295.
- Teijido, O., Casaroli-Marano, R., Kharkovets, T., Aguado, F., Zorzano, A., Palacin, M., Soriano, E., Martinez, A., and Estevez, R. (2007). Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol. Dis.* 26, 532-545.
- Teijido, O., Martinez, A., Pusch, M., Zorzano, A., Soriano, E., Del Rio, J.A., Palacin, M., and Estevez, R. (2004). Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2581-2594.
- Topcu, M., Gartioux, C., Ribierre, F., Yalcinkaya, C., Tokus, E., Oztekin, N., Beckmann, J.S., Ozguc, M., and Seboun, E. (2000). Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 733-739.
- Tran, M.D., Wanner, I.B., and Neary, J.T. (2008). Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 105, 272-286.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Stroink, H., van Nieuwenhuizen, O., Arts, W.F., Hoogenraad, F., and Valk, J. (1995). Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann. Neurol.* 37, 324-334.
- van der Knaap, M.S., Barth, P.G., Vrensen, G.F., and Valk, J. (1996). Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol.* 92, 206-212.
- van der Knaap, M.S., Valk, J., Barth, P.G., Smit, L.M., van Engelen, B.G., and Tortori Donati, P. (1995). Leukoencephalopathy with swelling in children and adolescents: MRI patterns and differential diagnosis. *Neuroradiology* 37, 679-686.
- Wachtel, M., Bolliger, M.F., Ishihara, H., Frei, K., Bluethmann, H., and Gloor, S.M. (2001). Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurochem.* 78, 155-162.
- Wolburg, H., Kastner, R., and Kurz-Isler, G. (1983). Lack of orthogonal particle assemblies and presence of tight junctions in astrocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). A freeze-fracture study. *Cell Tissue Res.* 234, 389-402.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75-96.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 Characterization of MLC1 expression in rat primary astrocyte cultures. (A) Left: MLC1 expression was tested by WB on extracts obtained from primary astrocyte cultures from rat cortex (cx) and hippocampus (hp) after 1, 2 or 3 weeks in culture. The expression of MLC1 was higher in hippocampus and increased with time in culture. Right: Detection of MLC1 in extracts obtained from astrocytes from hippocampus after 1, 2 or 3 weeks in the presence of the cell cycle inhibitor AraC or with mixed cultures with neurons (see Material and Methods). MLC1 expression levels in astrocyte cultures were lower in comparison with a co-culture of hippocampal astrocytes and neurons. β -actin was used as a loading control. (B,C) Immunocytochemistry of MLC1 using primary growing astrocyte cultures at different cell densities (B, Low density, AST LD and C, high density, AST HD) showed a diffuse cytoplasmatic distribution of MLC1. (D,E) Immunocytochemistry of MLC1 in cultures of astrocytes arrested in G0/G1 phase with AraC for 1 week (D, AST+ARAC1) or for 3 weeks (E, AST+ARAC3). In this case, after 1 week in culture, MLC1 had a diffuse cytoplasmatic labelling but also localized in contacts between astrocytes which started to appear. After 3 weeks, MLC1 was clearly located in astrocyte-astrocyte processes. (F,G) Immunocytochemistry of MLC1 in mixed cultures of astrocytes and neurons (AST + NEU) after 1 week (F) or 3 weeks (G) in culture. MLC1 was already visible in astrocyte junctions after 1 week in culture, compared with isolated astrocytes in the presence of AraC. In co-cultures, after 3 weeks, the processes between astrocytes were also more developed. (H,I) Comparison of the MLC1 localization of in mixed cultures (AST+NEU) in cell junctions at high density (HD) (H) or at low density cultures (LD) (I). At high density, MLC1 was visible in all the membrane, while in isolated astrocytes, MLC1 was only detected at the plasma membrane in auto-processes (arrow). Scale bar: 20 μ m.

Figure 2 Co-localization of MLC1 in rat primary astrocytes with different type of junction proteins. Double immunocytochemistry experiments of MLC1 with tight junction proteins ZO-1 (A) and occludin (B), and with adherent junctions proteins β -catenin (C) and N-cadherin (D) showed a large degree of colocalization (MERGE). (E) Double immunocytochemistry experiments with Cx43, a typical gap astrocytic junction protein, showed partial colocalization with MLC1. (F) No colocalization was observed between MLC1 and Vinculin (a typical marker of focal adhesions) and (G) Ezrin (a marker of growing astrocyte processes). Scale bar: 20 μ m.

Figure 3 Localization of mouse and human MLC1 in astrocyte junctions in tissue. A-B, Examples of double immunolabelling showing co-localization of MLC1 (18 nm gold particles) and ZO-1 (12 nm gold particles, arrows) in astrocyte-astrocyte junctions in mouse. C-H, In human tissue, N4 (C) and N5-human MLC1 (D) antibodies also showed post-embedding staining in the astrocyte-astrocyte junctions (18 nm gold particles, arrows) of astroglial processes in mouse hippocampus, and co-localized with ZO-1 (arrows in E and F) and occludin (arrows in G and H) in human cerebellum. Note that ZO-1, but not human MLC1, is also expressed in junctions between endothelial cells (E, boxed area and at higher magnification at the top right). F is a higher magnification of glial junctions in E. Occludin staining in junctions between endothelial cells is also shown (arrows in G). bl, basal lamina; bv, blood vessel; ec, endothelial cell; gc, glial cell, m, mitochondria. Scale bars in A-H= 500nm; high magnifications of boxed areas in E and G = 100nm.

Figure 4 Co-immunoprecipitation between MLC1 and ZO-1. Rat brain membranes were solubilised (Sol), and then, co-immunoprecipitation experiments were performed using anti-MLC1 coupled beads. Immunoprecipitation of MLC1 was highly efficient and specific, as nearly no MLC1 was detected in the non-bound (Nb) fraction of the immunoprecipitation using antibodies directed against MLC1, and no MLC1 protein was detected in the immunoprecipitate of an unrelated IgG (IP IgG) (Figure 4A). In the same manner as MLC1, which was enriched in the immunoprecipitate using antibodies directed against MLC1 (IP) (Figure 4A), a specific higher molecular weight protein band detected by the antibody directed against ZO-1 was also enriched (Figure 4B).

Figure 5 Relationship between MLC1 and the DGC complex. (A) MLC1 immunoreactivity (green) is identified around brain microvasculature. Note the intense staining evident mainly at larger brain capillaries. (B-D) However, there appears to be no change in MLC1 expression found at any of the dystrophic brain capillaries (denoted by dashed lines), i.e. *utrn*^{-/-}, *mdx*-*βgeo* and *α-dbn*^{-/-} respectively. Staining of *α*-Dystrobrevin (red), also known for its localization at astrocytic end-feet, is featured here confirming the disappearance of the *α*-dystrobrevin containing DAP complexes. Scale bars: 20 μ m. (E) Double immunostaining with the N4 antibody and antibodies against β -dystroglycan showed that the latter is expressed in astrocytes closer to the basal lamina, whereas MLC1 is located between glial cells. bl, basal lamina; bv, blood vessel; ec, endothelial cell; gc, glial cell. Scale bar, 200 nm. (F) Rat brain membranes were solubilised (Sol), and then, co-immunoprecipitation experiments were performed using anti-MLC1 coupled beads or BSA coupled beads. Immunoprecipitation (IP) of MLC1 was highly efficient and specific, as nearly no MLC1 was detected in the non-bound (Nb) fraction of the MLC1 IP, and no MLC1 protein was detected in the BSA IP. No antibody signal corresponding to Syntrophin (SYN), *α*-dystroglycan (*α*-DG), β -dystrobrevin (β -DB) and β -dystroglycan (β -DG) was seen in the MLC1 or the BSA IP. (G and H) Comparison of the staining of MLC1 and *α*-dystroglycan in rat growing astrocytes in culture (G) compared with rat astrocytes arrested in G0/G1 phase with AraC (H). Immunofluorescence staining of MLC1 (in red) showed a diffuse cytoplasmatic labelling in growing astrocytes, and a localized signal in quiescent astrocytic processes. In contrast, *α*-dystroglycan (in green) showed a localized labelling in the membrane and contacts within astrocytes in culture (B), compared with the diffused signal in astrocytes arrested. In both cases, there was a minor colocalization (MERGE) between both proteins. Scale bar: 20 μ m

Figure 6 Influence of the cytoskeleton on MLC1 localization in astrocytes. (A) Rat primary quiescent astrocytes stained with MLC1 (red) and phalloidin (green), which stain actin filaments. (B) Rat primary quiescent astrocytes stained with MLC1 (red) and β -tubulin (green), which stain microtubules. (C) Rat primary quiescent astrocytes stained with MLC1 (red) and GFAP (green), which stain intermediate filaments. (D) Cytochalasin-D treatment at 10 μ M for 2h, which depolymerises F-actin cytoskeleton, causes an alteration on cell morphology and a complete delocalization of MLC1. (E) Treatment of 10 μ g/ml colchicine for 20h (tubulin inhibitor) or (F) with 10 μ M taxol for 20h (tubulin stabilizer) promotes disruption of changes in the tubulin network, while no apparent change was observed in the localization pattern of MLC1. Scalebar (A-F): 20 μ m. (G) MLC1 (in red) and GFAP (in green) localization in astrocytes from wild type mouse (GFAP +/+) or in a transgenic mouse expressing in a heterozygous manner GFAP with a dominant mutation (R236H) found in Alexander disease patients (H). MLC1 localization in astrocytes surrounding blood vessels

is not altered in the transgenic mice. (I) MLC1 localization (in red) in a human brain sample from an Alexander patient was also unaltered. GFAP localization is also shown (in green). Scale bars: 25 μm (G-H); 20 μm (I)

Figure 7 Effect of hypoosmolarity on the localization of MLC1. After 3 weeks in culture, rat quiescent astrocytes were treated with a physiological solution or a hypoosmotic solution (170 mOsm) for 24 hours, fixed and processed by immunofluorescence using antibodies against MLC1 or β -catenin. After the treatment with the physiological solution (C), most of the MLC1 was located in junctions, in colocalization with β -catenin (Pearson's correlation coefficient: $R_r = 1.04 \pm 0.04$ ($n = 25$)). In contrast, after 24 hours in the presence of a hypoosmotic medium, most of the MLC1 protein was located intracellularly (D), whereas β -catenin was always located in astrocyte junctions (A and B). In (E), a high magnification of (D) is shown, where MLC1 localization was detected surrounding vacuole-like structures. (F) Detection of MLC1 by Western blot after 24 hours treatment with a medium of physiological, hypo or hyper osmolarity. Actin was used as a loading control. SCALE BARS: 20 μm .

Supplementary figures

Supplementary Figure 1. Localization of MLC1 in different KO mouse models of other proteins related with the DGC complex

MLC1 immunostaining (brown) in brain tissue of (A) wild type mice and in brain of (B) AQP4^{-/-}, and (D) Syntrophin^{-/-} mice. Staining was carried out as described by Boor et al., (2005). Nuclei were counterstained with haematoxylin. Scale bar: 20 μm .

Supplementary Figure 2. Localization of MLC1 in mouse astrocytes

(A) Representative fluorescent image of a primary culture of mouse astrocytes, in which MLC1 (green) is stained with glial fibrillary acidic protein (GFAP) (red) showing that MLC1 is located in astrocyte-astrocyte junctions (B-C). Double staining with MLC1 (in green) and β -Catenin (B, red) or ZO-1 (C, red) indicates colocalization between these proteins.

Supplementary Figure 3. Localization of HA-tagged human MLC1 in adenovirus-infected rat arrested astrocytes.

Rat astrocytes were transduced with adenoviruses expressing HA-tagged human MLC1. After 24 hours, cells were fixed and stained for the HA-antibody (A) or β -catenin antibody (B). In C we show the colocalization between both proteins.

Figure 1

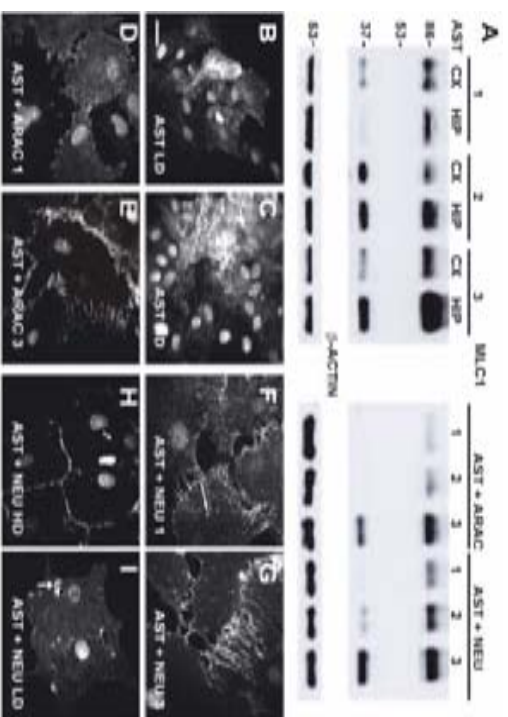


Figure 2

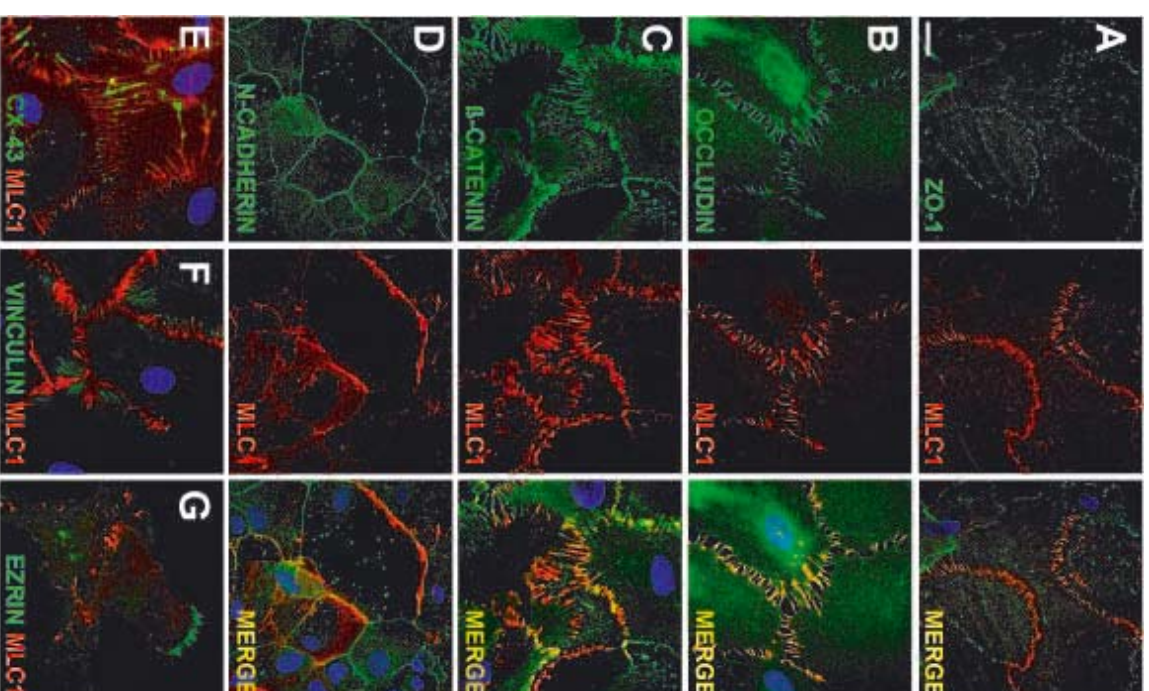


Figure 3

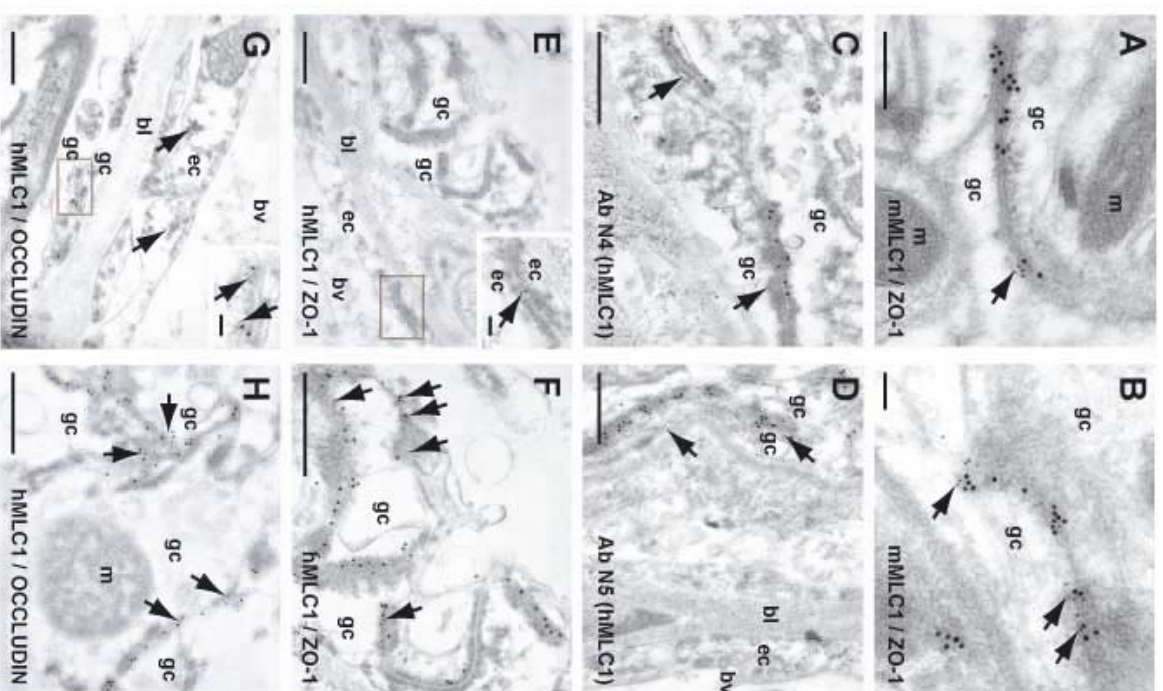


Figure 4

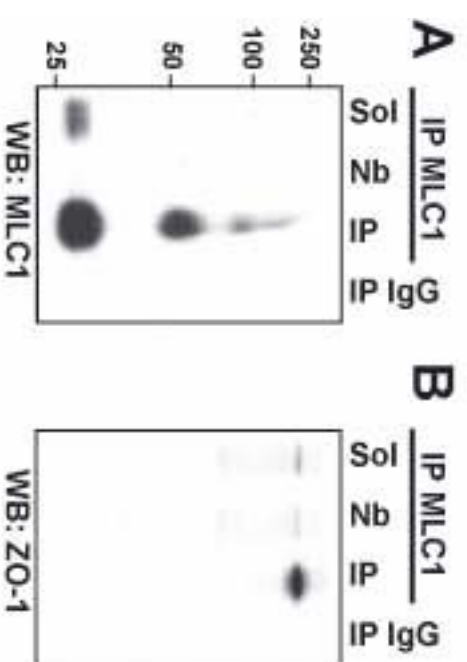


Figure 5

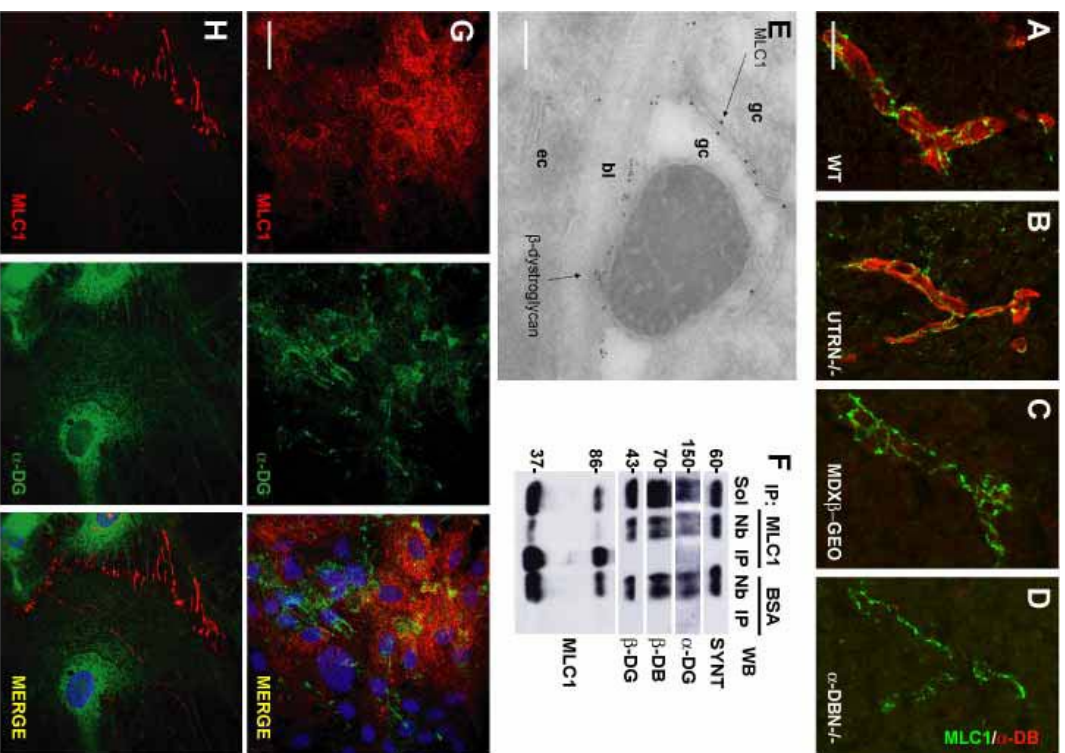


Figure 6

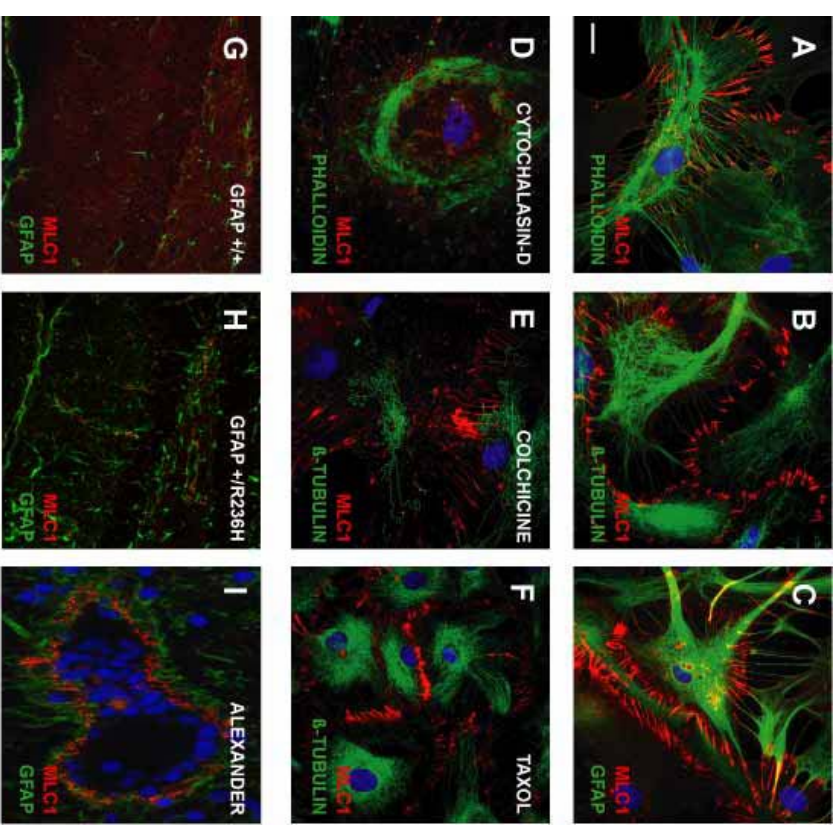
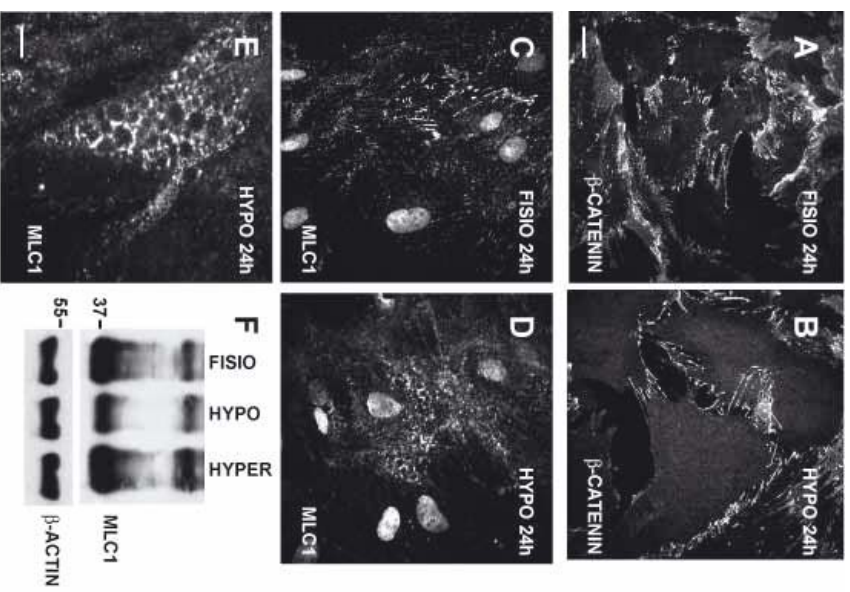
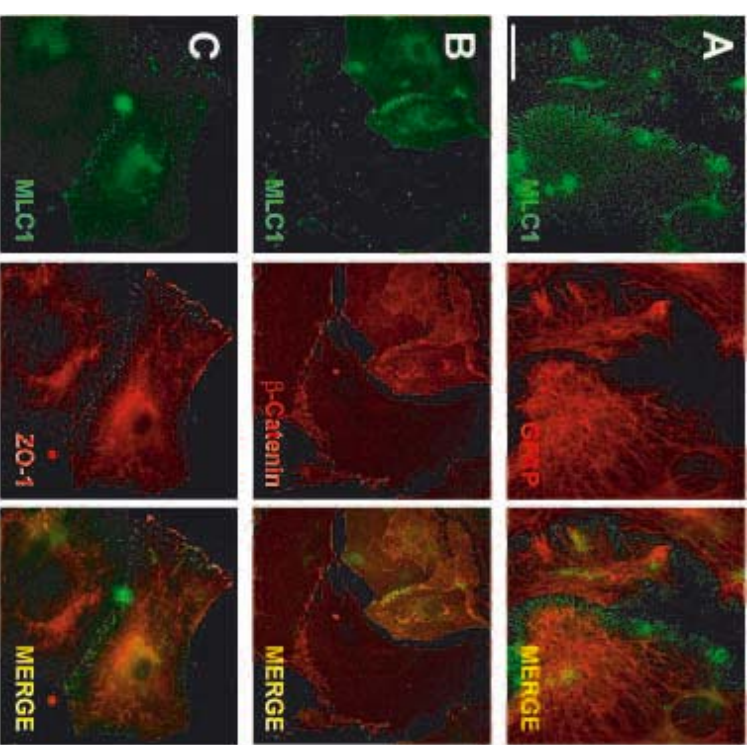


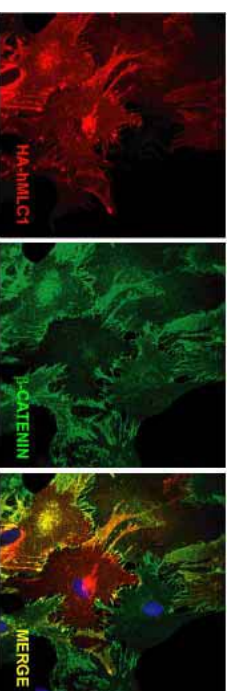
Figure 7



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3

