

Indices de abreviaturas y acrónimos

ADLTE	Epilepsia lateral temporal autonómica dominante
ADNFLE	Epilepsia nocturna frontotemporal autosómica dominante
ARMS	Sistema de amplificación refractaria
BNFC	
BSA	Suero de albúmina bovina
DMEM	
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxynucleótidos
FBS	Suero bovino fetal
FS	Crisis febriles
GEFS+	Epilepsia generalizada con crisis febriles plus
IGE	Epilepsia generalizada idiomática
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LRR	Repeticiones ricas en Leucina
NBI-BCIP	

Índice

NGF	Factor de crecimiento neural
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pNPP	
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
SOB	
SOC	
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-Page	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TEMED	N, N, N',N'- tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
TBS	
v/v	Relación volumen/ volumen
xg	Número de veces de la aceleración de la gravedad

1 Introducción

1.1 Epilepsia

1.1.1 Rasgos históricos y definición

1.1.1.1 Epidemiología

1.1.1.2 Etiología

1.1.1.3 Tratamiento y prognosis

1.1.2 Clasificación

1.1.3 Fisiopatología de la epilepsia

1.1.3.1 Canales iónicos

1.1.3.2 ADLTE

1.1.3.2.1 LGI1

1.1.3.2.2 Expresión de LGI1

1.1.3.2.3 Organización genómica y arquitectura de los dominios

1.1.3.2.4 Familia génica LGI

1.1.3.2.4.1 Localización genómica

1.1.3.2.4.2 Estructura genómica

1.1.3.2.4.3 Patrón de expresión

1.1.3.2.5 Función de la familia génica LGI

1.1.3.2.5.1 LGI1

1.1.3.2.5.1.1 Gen supresor de tumores

1.1.3.2.5.1.2 Gen supresor de metástasis

1.1.3.2.5.1.3 Subunidad del canal Kv1

1.1.3.2.5.1.4 Ligando de Adam 22

1.1.3.2.5.2 LGI4

2 Hipótesis y objetivos

3 Material y Métodos

3.1 Extracción de ADN de pacientes

3.2 Búsqueda de mutaciones en los genes LGI2, LGI3 y LGI4

3.3 Análisis estadístico de asociación de los polimorfismos encontrados con la aparición de la enfermedad en las familias.

3.4 Material Biológico

3.4.1 Cepas bacterianas

3.4.2 Líneas celulares de mamífero

3.5 Protocolos específicos de células de mamífero

3.5.1 Construcciones

3.5.1 Sistema de clonación

3.5.1 Vectores de expresión

3.5.2 Cebadores utilizados para la clonación de las construcciones

3.5.2 Cultivos celulares

3.5.3 Métodos de transfección

3.5.3.1 Transfección por fosfato cálcico

3.5.3.2 Transfección por liposomas

3.5.4 Procesado de muestras de los cultivos transfectados

3.5.4.1 Medio de cultivo

3.5.4.2 Medios celulares

3.5.5 Coinmunoprecipitación

3.5.6 Detección de proteínas mediante SDS-PAGE y Western blot

3.5.7 Estudio de glicosidación

3.5.8 Producción de medios condicionados

3.5.9 Ensayos de unión a la superficie celular (AP Binding)

3.5.10 Ensayos del efecto del tratamiento con LGI1 sobre la ruta ERK1/2

3.5.11 Ensayos de supervivencia celular en OLN93

3.6 Chip

4 Resultados y Discusión

4.1 Arquitectura de dominios de la familia génica LGI

4.2 La familia LGI codifica para proteínas glicosiladas y que se secretan

4.2.1 Secreción en tipos celulares

4.2.2 Glicosidación de las proteínas

4.2.3 El dominio EPTP como responsable en la secreción

4.3 Búsqueda de mutaciones en los genes parálogos

4.3.1 Identificación de polimorfismos en LGI2 y estudio poblacional

4.3.2 Identificación de polimorfismos en LGI3 y estudio poblacional

4.3.2 Identificación de polimorfismos en LGI4 y estudio poblacional

4.4 LGI como ligando extracelular

4.4.1 Unión de AP-LGI1 soluble a la membrana

4.4.2 Efecto de LGI1 sobre el estado de fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares ERK 1/2

4.4.3 Transducción de la señal

4.6 Caracterización funcional de LGI1

4.6.1 LGI1 como integrante del canal Kv1.1

4.6.2 LGI1 como factor de supervivencia de las OLN93

5 Discusión General

6 Conclusiones

7 Bibliografía

1 Introducción

1.1 Epilepsia

1.1.1 Rasgos históricos y definición

Etimológicamente la palabra epilepsia proviene del griego y significa sorpresa, ataque o caerse sobre sí mismo. Los griegos consideraban la epilepsia una enfermedad divina o sagrada, ya que “sólo Díos podía poseer una persona, sacudirla, hacerla caer, dejarla como muerta y después revivirla”.

No obstante, las primeras referencias que se conocen sobre la epilepsia se encuentran transcritas en las tablas cuneiformes neobabilónicas del Sakikku o “libro de todas las enfermedades” (718-612 ac). En estos escritos en tablas de piedra se hace una descripción muy adecuada de los aspectos clínicos de la enfermedad, si bien es cierto, que los asirios planteaban que los ataques epilépticos no eran más que la expresión de fuerzas sobrenaturales que actuaban sobre el individuo.

Fue primero Hipócrates (460-375 ac) y después Galeno (129-200 ac), quienes describieron que los ataques epilépticos provenían del cerebro. Sin embargo, durante siglos la epilepsia ha sido asociada a mitos e ideas fantasiosas emparentadas con demonios y maleficios.

En 1494 dos frailes dominicanos escribieron un manual para la identificación de brujas, el *Malleus Maleficarum*. En este libro se enumeraban una serie de características que las brujas cumplían, siendo la presencia de crisis epilépticas una de ellas, y llevó a la persecución, tortura y muerte de más de 200.000 mujeres.

Durante el “Tercer Reich”, dentro de los procedimientos utilizados por los Nacionalsocialistas se encontraban también los relativos a la “limpieza de la

Introducción

raza”, entre los que se incluía la “ley de prevención para enfermedades hereditarias de la descendencia”, que se aprobó por el gobierno del Reich. Entre las enfermedades hereditarias, según esta ley, se encontraban las siguientes; esquizofrenia, epilepsia hereditaria, el baile de San Vito hereditario (Corea de Huntington), etc...

Actualmente la epilepsia se define como una enfermedad crónica producida por diferentes etiologías, caracterizada por la repetición de crisis debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epiléptica), asociadas eventualmente a síntomas clínicos o paraclínicos (OMS). No todas las personas que padecen una crisis epiléptica se diagnostican de epilepsia.

Una crisis epiléptica es el resultado de una descarga neuronal cortical excesiva, que puede ser focal, generalizada o generalizarse secundariamente, y que es seguida de manifestaciones clínicas, produciendo un trastorno autolimitado de la consciencia, comportamiento, emoción o cualquier función cortical, dependiendo de la localización y características de las descargas.

Se pueden considerar tres características básicas para que el desarrollo de una descarga cerebral anómala produzca sincronía entre distintas zonas neuronales: En primer lugar la presencia de subpoblaciones de neuronas que posean características intrínsecas de generación de descarga. En segundo lugar la pérdida de los mecanismos de control inhibitorio postsináptico. Y por último, la existencia de un grado importante de acoplamiento sináptico excitatorio entre miembros de una población neuronal.

Las crisis epilépticas pueden clasificarse desde el punto de vista clínico en:

- Crisis parciales o focales: aquellas crisis en las que las manifestaciones clínicas y electroencefalográficas responden a la activación de un área

cerebral determinada, denominada foco epiléptico. Las crisis parciales a su vez, pueden ser:

- parciales simples: cuando durante la crisis se conserva el nivel de conciencia.
- parciales complejas: cuando existe alteración del nivel de conciencia.
- Crisis generalizadas: las manifestaciones clínicas responden a la activación de ambos hemisferios cerebrales.

1.1.1.1. Epidemiología

La epilepsia es una enfermedad que no discrimina entre razas sociales, culturales o geográficas. La padecen tanto mujeres como hombres y la edad de inicio puede ser cualquiera, si bien la infancia, la pubertad o el adulto de mayor de 60 años son los tres grandes grupos donde existe un mayor índice de casos (Hauser WA Neurology aug et al. 1993).

Cualquier persona puede sufrir alguna crisis, de hecho, un 5% de la población mundial sufre o ha sufrido una crisis a lo largo de su vida, aunque el diagnóstico de epilepsia se reserva para aquellas personas que han sufrido al menos dos crisis que no han sido provocadas.

El número de nuevos casos de epilepsia al año a nivel mundial oscila entre 24 y 53 casos/100000 habitantes. En Europa, de los estudios de prevalencia realizados en distintos países y años, se calcula que el número de niños y adolescentes con epilepsia activa es de 0,9 millones, mientras que esta cifra alcanza los 1,9 millones en personas de entre 20 y 64 años y 0,6 millones de mayores de 65 años {Forsgren, 2005 #55} Una de las causas de esta alta

Introducción

incidencia es la gran exposición que tenemos actualmente a situaciones que pueden causar un daño permanente en nuestro cerebro.

La epilepsia es una condición clínica crónica tratable. Aproximadamente en el 50% de los casos se consigue una remisión temprana de las crisis con el primer tratamiento, en el 25-35% de los casos se logra tras uno o más cambios de tratamiento, dejando un 15-25% de pacientes que son resistentes a las drogas utilizadas.

1.1.1.2. Etiología

Todos los factores que pueden afectar al cerebro; traumas cerebrales, neoplasmas, enfermedades degenerativas, infecciones, enfermedades metabólicas, etc... predisponen a un sujeto a padecer epilepsia {Vinters, 1993 #6}. Cualquier daño en el cerebro puede causar epilepsia, aunque no todas las personas con la misma afectación neurológica tienen por que sufrir ataques o crisis.

Sin embargo, se están encontrando cada vez más factores genéticos a los que se puede atribuir con relativa facilidad como los responsables de padecer epilepsia. Este tipo de epilepsias (sin un daño cerebral aparente) se denominan idiopáticas y la mayoría de ellas están causadas por mutaciones en canales iónicos {Steinlein, 2004 #51}.

1.1.1.3. Tratamiento y pronóstico

La epilepsia no es una enfermedad para toda la vida. Se calcula que la duración media de la enfermedad es de 10-12 años ya que existen epilepsias que se inactivan con el paso del tiempo, ya sea por su evolución natural o bien por responder de forma satisfactoria a la medicación.

Actualmente, el 70% de los nuevos casos diagnosticados en niños y adultos responden adecuadamente al tratamiento con fármacos, y después de 2-5 años de toma, el 60% de los pacientes pueden dejar el tratamiento sin sufrir recaída alguna.

Sin embargo, a pesar del relativo éxito de los tratamientos, todas las terapias de las que se disponen hoy en día son sintomáticas, es decir, las personas afectadas por epilepsia pueden tomar fármacos que evitan la aparición de las crisis, pero no curan la enfermedad. Igualmente, está comprobado que el inadecuado control de un paciente epiléptico puede conducir al daño cerebral permanente y a trastornos del aprendizaje.

Por todo esto, resulta de gran importancia identificar los mecanismos moleculares por los que se produce la epilepsia, a fin de localizar nuevas dianas moleculares que permitan desarrollar fármacos antiepilépticos más efectivos para cada caso.

1.1.2 Clasificación

Las epilepsias son un grupo muy extenso y heterogéneo de enfermedades el cual resulta muy difícil de clasificar. La situación se hace aún más compleja al considerar las más de 200 enfermedades genéticas en las que la epilepsia es parte del fenotipo {Steinlein, 2004 #51}.

Las manifestaciones de la epilepsia son múltiples y dependen del área cerebral afectada, motivo por el cual se han ideado diferentes clasificaciones. Se han utilizado muchos enfoques para clasificar las epilepsias, utilizando varios parámetros; etiología, duración, factores precipitantes, post-ictales y aura. La clasificación ha evolucionado bajo los impulsos de la Liga Internacional contra la Epilepsia hasta dar lugar a la clasificación aceptada en 1989. Esta clasificación representada en la **tabla 1**, se basa en las diferencias entre los síndromes

Introducción

relacionados con la localización, los síndromes generalizados, los síndromes de localización indeterminada y los síndromes especiales.

Dentro de cada categoría se distinguen, además, 3 grupos: **síndromes sintomáticos** (cuando existe una etiología conocida como causa de las crisis), **síndromes idiopáticos** (en los que no existe otra enfermedad que la propia epilepsia, es decir, no existe otra causa determinante que no sea una propensión de origen genético de la corteza cerebral a generar crisis epilépticas) y **síndromes criptogénicos** (epilepsias en las que se sospecha una causa sintomática pero no puede ser determinada).

Tabla 1. Clasificación Internacional de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989)

Epilepsias y síndromes relacionados con la localización (Focal, Parcial)
1. Idiopática (inicio relacionado con la edad)
Epilepsia benigna de la infancia con puntas centrotemporales
Epilepsia de la infancia con paroxismo occipital
Epilepsia primaria de la lectura
2. Sintomática
Epilepsia parcial continua progresiva de la niñez
Epilepsia refleja
Epilepsia del lóbulo temporal
Epilepsia del lóbulo frontal
Epilepsia del lóbulo parietal
Epilepsia del lóbulo occipital
3. Criptogénicos
Epilepsias y síndromes generalizados
1. Idiopáticos (relacionados con la edad de inicio)
Convulsiones neonatales benignas familiares
Convulsiones neonatales benignas
Epilepsia mioclónica benigna de la infancia
Epilepsia con ausencias infantil (picnolepsia)
Epilepsia mioclónica juvenil
Epilepsia con ausencias juvenil
Epilepsia con crisis tónico-clónicas generalizadas del despertar

Otras epilepsias generalizadas idiopáticas
Epilepsias con crisis de precipitación específicas
2. Criptogénicas o sintomáticas
Síndrome de West
Síndrome de Lennox-Gastaut
Epilepsia con crisis mioclono-astáticas
Epilepsia con ausencias mioclónicas
3. Sintomáticas
De etiología no especificada
Encefalopatía mioclónica precoz
Encefalopatía epiléptica infantil precoz con brotes de supresión
Otras epilepsias generalizadas sintomáticas
De etiología específica
Epilepsias y síndromes epilépticos de localización indeterminada
1. Con crisis generalizadas y parciales
Crisis neonatales
Epilepsia mioclónica grave de la infancia
Epilepsia con punta de onda continua durante el sueño lento
Afasia epiléptica adquirida (síndrome Landau-Kleffner)
2. Otras epilepsias de localización indeterminada
Síndromes Especiales
1. Crisis circunstanciales
Convulsiones febriles
Crisis epiléptica o status epiléptico aislado
Crisis relacionadas con procesos metabólicos o tóxicos agudos

Además, se incluye un esquema diagnóstico que se fundamenta en 5 niveles o ejes: fenomenología ictal, tipo de crisis, síndrome, etiología y afectación, dando lugar a una clasificación puramente descriptiva de los fenómenos clínicos durante las crisis.

Para la aplicación de estos ejes se elaboró un Glosario de Terminología Descriptiva para la Semiología de las Crisis {Blume, 2001 #57} para estandarizar la terminología y facilitar así la comunicación y la uniformidad, así como una lista con los Tipos de Crisis y estímulos Desencadenantes (Anexo Tabla I), que

Introducción

consideraron entidades diagnósticas en si mismas, y una lista abierta de Síndromes Epilépticos Establecidos (Anexo Tabla II) incluyendo condiciones que cursan con crisis epilépticas que no requieren un diagnóstico de epilepsia.

1.1.3 Fisiopatología de la epilepsia

Las crisis epilépticas recurrentes así como las esporádicas, están causadas por numerosos factores, dentro de los cuales se incluyen el daño cerebral, estados metabólicos alterados y malformaciones de nacimiento.

Sin embargo, el 1% de los pacientes que sufren epilepsia no presentan ninguna anomalía neurológica. Este tipo de epilepsias se denominan epilepsias idiopáticas, y se asume que presentan un origen genético. En las epilepsias genéticamente determinadas, encontramos todas las formas posibles de herencia; autosómica, ligada al cromosoma X, de herencia mitocondrial y de herencia compleja {Steinlein, 2004 #51}.

La herencia autosómica recesiva es forma de herencia más común en aquellas epilepsias con edad de inicio temprana y curso progresivo, como son la enfermedad de Lafora y la enfermedad de Unverricht-Lundborg (Steinlein 2004).

La herencia autosómica dominante es característica de aquellas epilepsias idiopáticas monogénicas, es decir, la presencia de un solo alelo mutado de un gen es capaz de causar epilepsia en los pacientes que presentan dicha mutación. Sin embargo, los estudios familiares realizados hasta el momento, demuestran que estas mutaciones no suelen presentar el 100% de penetrancia, y además, la edad de inicio y la severidad del fenotipo varían entre pacientes con la misma mutación. Esto indica que la expresión de genes que están implicados en la aparición de epilepsias, puede estar a su vez modificada por genes que se encuentran aún por identificar y por factores medioambientales.

Un ejemplo de epilepsia idiopática con más de una forma de herencia es la epilepsia generalizada con crisis febriles plus (GEFS+). Este fenotipo se encuentra asociado tanto a mutaciones en genes que codifican canales de sodio (SCN1A, SCN2A, SCN1B) como a mutaciones en genes que codifican receptores gabaérgicos (GABRG2 y GABRA1).

1.1.1.3. Canales iónicos

Las epilepsias idiopáticas están mayormente causadas por mutaciones en genes que codifican para canales iónicos o sus subunidades. Los canales iónicos son moléculas proteicas que contienen poros acuosos que permiten el flujo de iones a través de las membranas celulares. La excitabilidad de las neuronas y la comunicación entre ellas dependen de la acción de varios canales. El canal iónico, no sólo controla el tipo de ión que pasa a través de él, sino también la dirección del paso. A su vez, los canales iónicos son capaces de alterar rápidamente la permeabilidad de la membrana a ciertos iones, y esto, por ejemplo, puede hacer que una neurona en potencial de reposo cambie a un estado de potencial activo, o viceversa. No es extraño, por tanto, que los canales iónicos tengan un papel importante en aquellas enfermedades que están asociadas con hiperexcitabilidad, ya que esta excitabilidad se puede deber a una menguada o exagerada función del canal específico.

Los canales iónicos se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligando y canales mecanosensibles. Hasta la fecha, se conocen mutaciones en 15 tipos diferentes de canales que causan epilepsias idiopáticas. (tabla 2)

Tabla 2. Genes que están relacionados con epilepsias idiopáticas

Gen	Síndromes ^a	Cromosomas
Canal de Calcio		
CACNB4	IGE, JME	2q22-23
CACNA1A	EA2, FHM, SCA6, IGE	19
CACNA1H	CAE	16p13.3
Canal de Cloro		
CLCN2	CAE, EGMA	3q26
Canal de Potasio		
KCNQ2	BFNC1, BFNC/myoymia	20q13.3
KCNQ3	BFNC2	8q24
KCNA1	EA1, epilepsia parcial	12p13
Canal de Sodio		
SCN2A	BFNIS, GEFS+	2q23-q24.3
SCN1B	GEFS+1	19q13.1
SCN1A	GEFS+2	2q24
Receptor de Acetilcolina		
CHRNA4	ADNFLE 1	20q13.2-q13.3
CHRN2	ADNFLE 3	1p21
Receptor GABA		
GABRA1	JME	5q34
GABRG2	GEFS+ 3, CAE	5q34
GABRD	GEFS+	1p36.3

^a IGE, epilepsia generalizada idiopática; JME, epilepsia mioclónica juvenil; EA2, ataxia episódica; FHM, migraña hemipléjica familiar; SCA, ataxia espinocerebelar; CAE, epilepsia de ausencias infantil; EGMA, epilepsia con crisis gran mal del despertar; BFNC, convulsiones neonatales familiares benignas; GEFS+, epilepsia generalizada con crisis febriles plus; ADNFLE, epilepsia frontal nocturna autosómica dominante

Los canales que están implicados en la aparición de la epilepsia idiopática pertenecen tanto a aquellos canales dependientes de voltaje, los cuales son importantes para la generación y control de potenciales de acción en la membrana, como aquellos canales operados por ligando, que están implicados en transmisión sináptica. En ambos casos, la forma del canal cambia para dejar pasar o impedir el paso de cada uno de los iones que controlan. El estudio de las

diferentes mutaciones en los genes de los canales iónicos, no sólo explica parte de la fisiopatología y en algunos casos el fenotipo, sino que va orientado a indagar sobre el tratamiento más acertado y óptimo.

Los canales iónicos están directamente relacionados con la excitabilidad de la membrana y la liberación de neurotransmisores. El correcto funcionamiento del córtex cerebral se basa en el equilibrio entre la entrada y salida de iones, pudiendo cualquier disturbio en este equilibrio causar una hiperexcitabilidad incontrolada. Por otra parte, los canales iónicos tienen un papel relevante en la sincronización y en la propagación de las descargas que producen las crisis, independientemente de las causas que lo provoquen (Armijo JA, de las Cuevas I. Canales iónicos y epilepsia. Rev Neurol 2000; 30 (Sup) s25-s41)

Sin embargo, no hay que olvidar que existen otras vías neurológicas que pueden llevarnos a un estado de hiperexcitabilidad. De hecho, mutaciones en genes que estén implicados en plasticidad neuronal, desarrollo neuronal o metabolismo neuronal, son candidatos potenciales a ser causantes de epilepsia. El primer gen descrito cuyas mutaciones causan epilepsia y que no codifica para un canal iónico es *LGI1*. Mutaciones en este gen causan epilepsia lateral temporal autosómica dominante (ADLTE), epilepsia sujeta a estudio en esta tesis.

1.1.3.2 ADLTE

La epilepsia lateral temporal autosómica dominante o epilepsia parcial con síntomas auditivos (ADLTE, MIM #600512) es una enfermedad neurológica que cursa con crisis parciales simples visuales (imágenes simples) o auditivas (zumbido, ruido de maquinaria) que frecuentemente presentan generalización secundaria y que aparecen en las primeras horas de sueño. Las crisis son escasas y responden bien a los fármacos antiepilépticos, aunque con frecuencia reaparecen al suspender la medicación.

Introducción

No suele haber estupor postcrítico, aunque los pacientes refieren cefalea después de las crisis. El EEG intercrítico habitualmente es normal, aunque puede detectarse actividad epiléptica a nivel temporo-occipital, generalmente unilateral. La neuroimagen es normal

Este cuadro clínico fue descrito en 1995 por Ottman y colaboradores {Ottman, 1995 #48}, quienes, además, mapearon esta enfermedad al cromosoma 10q. Hasta entonces se creía que sólo las epilepsias denominadas generalizadas tenían un componente genético. Sin embargo, este estudio fue la primera evidencia descrita de que una epilepsia parcial tuviese una causa genética. El estudio se basaba en el análisis de ligamiento en una gran familia de tres generaciones, dentro de las cuales había 10 individuos afectados que permanecían vivos. El resultado del ligamiento reveló que los 10 pacientes de la familia compartían un haplotipo mínimo común en una región de 10cM comprendida entre los marcadores D10S185 y D10S192 del cromosoma 10q24..

En 1999, Poza y colaboradores {Poza, 1999 #47} acotaron a 3cM la región mínima donde el gen responsable de esta epilepsia podría estar localizado, gracias, esta vez, a una gran familia de origen vasco que presentaba los mismos síntomas clínicos que la familia descrita por Ottman y colaboradores en 1995. En este nuevo estudio, se analizaron los resultados de 30 marcadores en 13 pacientes. Los marcadores de este estudio que tuvieron mayor puntuación solapaban con el intervalo descrito por Ottman, redefiniendo una región de 3cM común donde el posible gen responsable de esta enfermedad podría estar localizado.

En el 2002, nuestro grupo se encontraba secuenciando genes localizados en esos 3 cM, cuando encontraron dos mutaciones (**c.758delC** y **c.1420C>T**) {Morante-Redolat, 2002 #7} en el gen *LGI1* en dos familias no relacionadas pero afectadas por el mismo síndrome epiléptico.

Simultáneamente, Kalachikov y colaboradores también encontraron 5 mutaciones en *LGI1* en pacientes enfermos de este tipo de epilepsia (**E283A**, **c.1639insA**, **c.835delC**, **IVS3(-3)C>A** y **c.1050-1051delCA**) {Kalachikov, 2002 #10}. Ninguno de estos cambios se encontró en población control sana, de manera que se definió a *LGI1* como el gen cuyas mutaciones eran responsables de la aparición de ADLTE.

Desde entonces y hasta la fecha, se han encontrado un total de 20 mutaciones (Figura 1) en la secuencia de *LGI1* en pacientes con Epilepsia Lateral Autosómica Dominante {Kalachikov, 2002 #10; Morante-Redolat, 2002 #7; Fertig, 2003 #20; Kobayashi, 2003 #15; Michelucci, 2003 #17; Berkovic, 2004 #70; Hedera, 2004 #30; Ottman, 2004 #26; Pisano, 2005 #44}. Estas mutaciones se han identificado a lo largo de toda la secuencia del gen y siempre en heterocigosis. Aunque las manifestaciones clínicas presentan variaciones entre familias, todas ellas se caracterizan por una predominancia de crisis parciales con componente auditivo. No se han encontrado, sin embargo, evidencias que sugieran cambios en el fenotipo dependiendo de qué tipo de mutación (mutación que implique cambio aminoacídico o mutación que genere proteínas truncadas) haya en la proteína, a pesar de que algunas de las mutaciones provocan la aparición de codones de parada muy prematuros {Kalachikov, 2002 #10; Hedera, 2004 #30}.

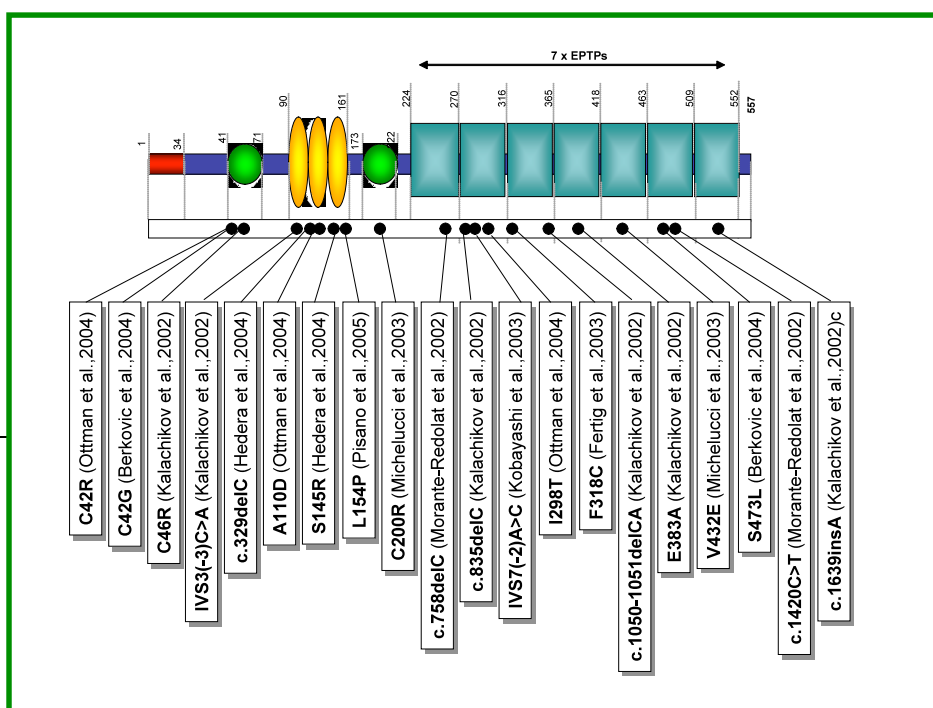


Figura 1. Localización de las mutaciones en *LGI1* descritas hasta la fecha.

1.1.3.2.1 *LGI1*

LGI1 fue descrito por primera vez como un gen supresor de tumores {Chernova, 1998 #13}. En 1998 el grupo de Chernova y colaboradores se encontraba tratando de identificar genes en el cromosoma 10 implicados en la aparición y progresión de glioblastomas. La línea celular de glioblastoma T98G carece de una copia completa del cromosoma 10 y sufre una translocación balanceada entre la otra copia del cromosoma 10 y el cromosoma 19 que afecta a la región 10q24 t(10;19),(q24;q13). Analizando esta región, mediante una estrategia de clonación posicional lograron aislar un nuevo gen, de función desconocida, que se encontraba truncado por el punto de ruptura de la translocación. Este nuevo gen codificaba para una proteína con dominios ricos en leucina en su extremo C Terminal, así que se le llamó *LGI1* (Leucline-rich Glioma inactivated).

1.1.3.2.2 *Expresión de LGI1*

Para analizar el perfil de expresión de esta nueva proteína, Chernova y colaboradores utilizaron un clon que tenía gran parte de la secuencia codificante de *LGI1* para sintetizar una sonda de RNA y mediante la técnica de Northern blot,

analizaron muestras de diversos tejidos. Encontraron que LGI1 se expresaba mayoritariamente en cerebro y músculo esquelético, mientras que no había expresión en corazón, riñones, pulmones, placenta, hígado o páncreas. La sonda detectó dos transcritos: uno de 2,4 kb y otro de 1,6kb. En el caso del cerebro el transcrito más abundante resultó ser el de 2,4kb mientras que en músculo esquelético ambos transcritos se encontraron por igual (Figura 2A).

El análisis de expresión en distintas regiones cerebrales mediante Northern blot reveló una expresión bastante generalizada de los dos transcritos aunque con diferente intensidad según regiones. La expresión con mayor intensidad se observó en cerebro total, córtex, hipocampo y putamen, y la de menor intensidad en el corpus callosum. (Figura 2B)

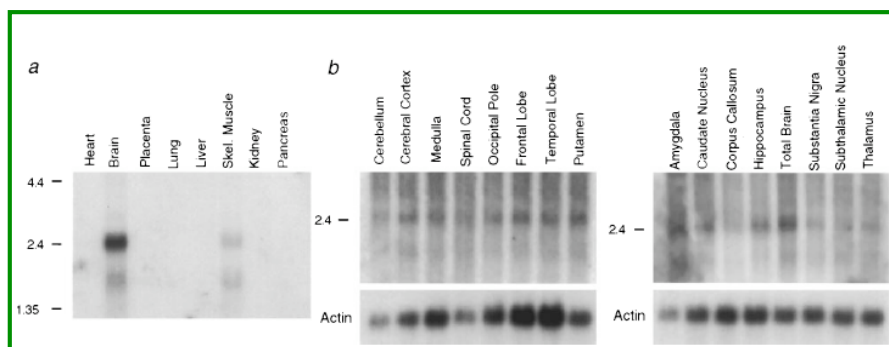


Figura 2. Expresión de LGI1 mediante Northern blot. A) Expresión en distintos tejidos B) Expresión en distintas regiones del SNC {Chernova, 1998 #13}

En 2002, Kalachikov y colaboradores analizaron la expresión de LGI1 en el cerebro de ratón adulto y determinaron, mediante hibridación *in situ*, que se expresaba en el córtex piriforme, en la amígdala y en el giro dentado del hipocampo {Kalachikov, 2002 #10}. El grado de expresión de LGI1 variaba entre

Introducción

los diferentes núcleos del cerebro y entre células dentro de los núcleos del cerebro, indicando una regulación de la transcripción muy localizada postulando, a su vez, la posible implicación funcional que una diferencia en la cantidad de LGI1 producida podría tener.

Los estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo por nuestro grupo con los anticuerpos P01C258 y P01C262 {Morante-Redolat, 2002 #7; Morante-Redolat, 2002 #7} revelaron una expresión generalizada de LGI1 en las neuronas del cerebro de ratón adulto, siendo la expresión en glía prácticamente nula. También se encontró que había un mayor nivel de expresión en ciertas regiones del cerebro como el hipocampo y el córtex piriforme, estando estos resultados de acuerdo con lo que Kalachikov y colaboradores habían presentado anteriormente con su hibridación *in situ* {Kalachikov, 2002 #10}.

1.1.3.2.3 Procesamiento alternativo

LGI1 se expresa mayoritariamente en cerebro sin prácticamente diferencias en el nivel de expresión entre las diferentes áreas cerebrales. Sin embargo, cuando Morante-Redolat y colaboradores {Morante-Redolat, 2002 #7} hicieron un *Northern blot* a partir de ARNm de cerebro, además de las dos especies mayoritarias encontradas por Chernova y colaboradores de 2,4 Kb y 1,6 Kb, encontraron una especie de 3,2 Kb (Fig 3 A).

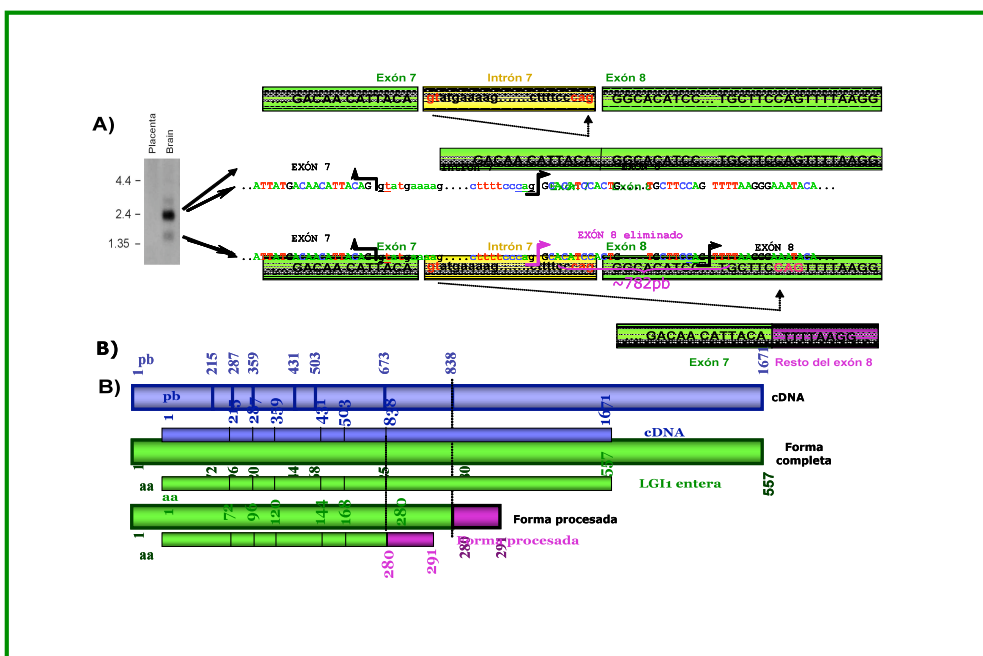


Figura 3. Procesamiento alternativo de LGI1. LGI1 sufre un procesamiento alternativo dando lugar a dos isoformas de distinto tamaño.

A partir de una librería de cDNA humano se clonaron tanto la especie de 2,4 Kb, como la especie de 1,6 Kb. El resultado de la secuencia reveló que la banda de 2,4 Kb correspondía al cDNA completo de LGI1. Por otra parte, la especie de tamaño 1,6 Kb resultó ser una variante de la forma completa de LGI1, en la cual el exón 7 habría sufrido un procesamiento alternativo debido a la utilización de un sitio críptico situado en el interior del exón 8 (Figura 3 A). Este procesamiento, produciría una delección de las primeras 782 pb del exón 8 y como consecuencia, un cambio en la pauta de lectura, de manera que se introduciría un codón de parada prematuro. En caso de ser traducida, esta variante daría lugar a una proteína de 291 aminoácidos y un peso estimado de 33 kDa (Figura 3b).

No se consiguió clonar la banda de 3,2 kDa, de manera que se desconoce si se trata de otro procesamiento alternativo o se trata de una variante que utilice una señal de poliadenilación diferente.

1.1.3.2.4 Organización genómica y arquitectura de los dominios

Con ayuda de herramientas bioinformáticas, el grupo de Cowell {Chernova, 1998 #13; Somerville, 2000 #12} describió que el cDNA de *LGI1* constaba de 2254pb (tamaño que estaría en concordancia con el tamaño del transcrito encontrado en el Northern blot) presentando una pauta abierta de lectura (ORF) de 1674pb que comenzaría en la posición 225 con un codón ATG y terminaría en la posición 1895 con un codón de stop TGA.

En la región 3' UTR del mensajero se identificó un sitio de poliadenilación. Sin embargo, en la región anterior al inicio de la transcripción no se hallaron secuencias que indicaran la presencia de un promotor (cajas TATAA o CAAT).

Introducción

Aún así se delimitó una región mínima de 597pb capaz de dirigir la expresión del gen de la luciferasa en un estudio *in vitro*. {Somerville, 2000 #12}

Además, mediante herramientas informáticas de predicción establecieron que *LGI1* estaría codificada por 8 exones, de tamaños entre 72pb y 1197pb, dando lugar a una proteína de 557 aminoácidos con un peso molecular calculado de 64 kDa. Determinaron también que al comienzo de su secuencia (aminoácidos 1-34), *LGI1* presentaba una región hidrofóbica que actuaría como péptido señal siendo eliminado por corte proteolítico entre la Gly34 y la Lys35, para dar lugar a la proteína madura de 60 kDa que se dirigiría hacia la membrana. Por otra parte, predijeron la existencia de otra región hidrofóbica (aminoácidos 228-309), codificada por el exón 8, que constituiría un dominio transmembrana. Este dominio, formado por una única hélice, atravesaría la membrana una vez dejando la región N Terminal en el exterior celular. En la región comprendida entre el péptido señal y el dominio transmembrana identificaron un dominio constituido por Repeticiones Ricas en Leucina (LRRs) flanqueadas por dos dominios ricos en Cisteína. (Figura 4)

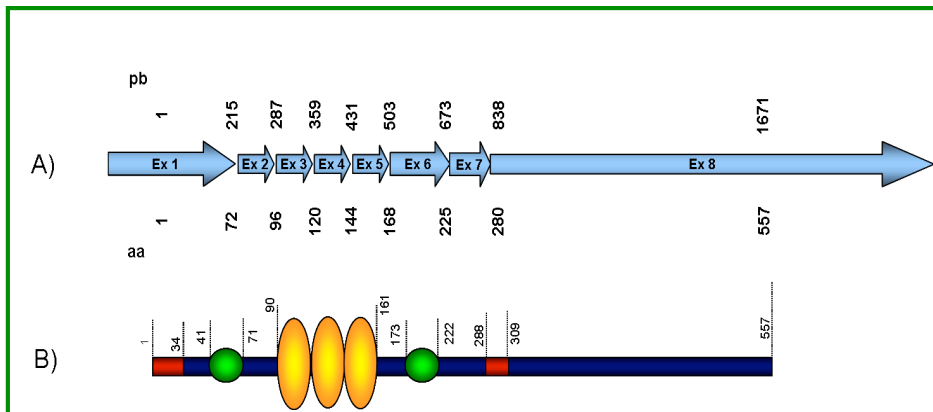


Figura 4. Representación A) de la organización exón-intrón del gen *LGI1* y B) la distribución de motivos estructurales a lo largo de la secuencia (Somerville et al., 2000).

Las LRRs encontradas en *LGI1*, tres repeticiones y media según Chernova {Chernova, 1998 #13}, cuatro y media según Somerville {Somerville, 2000 #12}, presentan una Fenilalanina conservada en posición 20 dentro de la repetición lo que las incluye en la familia F-20 de proteínas ricas en Leucina. La combinación de repeticiones ricas en Leucina y dominios flanqueantes ricos en Cisteína, por otra parte, es una característica típica de proteínas extracelulares o dominios en la porción extracelular de proteínas de membrana {Buchanan, 1996 #50}. En la región C terminal, teóricamente intracelular, no lograron encontrar homología con ningún dominio conocido.

En la secuencia de *LGI1* encontraron dos sitios potenciales de N-glicosilación (Asn 192 y Asn 277) en el dominio N-terminal, así como una Serina (Ser313) y una Tirosina (Tyr384) potencialmente fosforilables por acción de la protein kinasa dependiente de cAMP o tirosin kinasas. Además, encontraron varias dianas de fosforilación para la Protein Kinasa C (PKC) y la Casein Kinasa II.

Los estudios *in silico* llevados a cabo mediante el programa SMART por Morante-Redolat y colaboradores {Morante-Redolat, 2002 #7}, revelaron un nuevo dominio en el extremo C Terminal, consistente en una secuencia repetida dos veces en las posiciones 226-361 y 420-549 de 136 y 130 aminoácidos respectivamente. Curiosamente, el dominio transmembrana predicho por Chernova y colaboradores {Chernova, 1998 #13} se encontraría situado justo en la primera repetición de este nuevo dominio {Morante-Redolat, 2002 #7}. (Figura 5 A)

Introducción

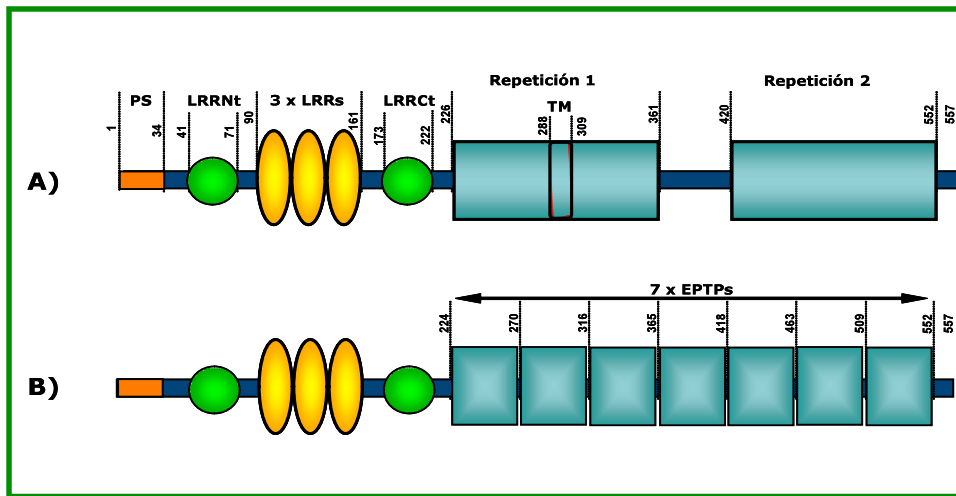


Figura 5. Arquitectura de dominios de LGI1. A) según Morante-Redolat y colaboradores {Morante-Redolat, 2002 #7} con la región transmembrana predicha por Chernova y B) según Scheel y colaboradores {Scheel, 2002 #5}.

En el estudio llevado a cabo por Scheel y colaboradores {Scheel, 2002 #5}, encontraron que la proteína VLGR1/MASS1 (proteína que se encuentra mutada en el modelo de ratón Frings que sufre epilepsia audiogénica) presentaba en la región de su secuencia comprendida entre los amino ácidos 3250 y 3550, una secuencia de 46 residuos que se repetía en tándem (Fig 5 B). Un análisis más exhaustivo mediante el programa de predicción HMM, definió este nuevo dominio como 6 repeticiones en tándem de una secuencia de 42-44 residuos que se hallaba presente tanto en la proteína VLGR1/MASS1 humana como en la de ratones. Cuando hicieron una búsqueda en la base de datos de proteínas (Genbank) encontraron que LGI1 también presentaba ese dominio, dominio al que denominaron EAR (Epilepsy-associated repeat) y cuya nueva representación queda plasmada en la figura 5 B. Una de ellas era *LGI1* y otra de ellas era la proteína KIAA1916 (nº acceso al GenBank AB067503), proteína que había sido propuesta como parálogo de *LGI1* por Morante-Redolat y colaboradores {Morante-Redolat, 2002 #7}. En ambas proteínas, este dominio aparecía

localizado en el extremo C terminal, mientras que en el extremo N terminal ambas proteínas presentaban 3 regiones ricas en Leucina flanqueadas en ambos extremos por regiones ricas en Cisteínas. La tercera proteína, resultó ser una entrada anónima a la base de datos (nº acceso al GenBank BCo21197) caracterizada por un dominio N Terminal de tipo Trombospondin (TSP-N).

1.1.2.3.6 Familia génica

Rastreando una genoteca de cDNA de ratón con una sonda del gen *LGI1* humano, Chernova y colaboradores {Chernova, 1998 #13} lograron identificar un gen con un 91% de identidad a nivel nucleótido y 97% a nivel de secuencia proteica. Este ortólogo de *LGI1* (GDB AF246818) también estaba codificado por 8 exones.

En el 2002, Morante-Redolat y colaboradores {Morante-Redolat, 2002 #7} llevaron a cabo una búsqueda de genes homólogos a *LGI1* con el programa BLAST2 (Advanced Search Service of EMBL) utilizando como cebo la secuencia encontrada en el extremo C Terminal. Lograron identificar un parálogo de *LGI1* codificado por el gen KIAA1916 (nº de acceso al Genbank ABO67503) y que se localizaba en el cromosoma 4p15.1. Estudios *in silico* sugirieron que este parálogo estaba organizado en 8 exones, codificaba para un polipéptido de 545 amino ácidos y presentaba una identidad de 57% a nivel nucleótido y una similaridad de 73% con la secuencia de *LGI1*.

Combinando estudios *in silico* con estudios de clonaje posicional, Gu y colaboradores {Gu, 2002 #6} identificaron 3 nuevos parálogos de *LGI1*, que se denominaron *LGI2*, *LGI3* y *LGI4*. Estas tres proteínas junto con *LGI1*, constituirían una nueva subfamilia, denominada familia *LGI*, que estaría incluida dentro de la familia de las proteínas con repeticiones ricas en Leucina. Para ello, realizaron la búsqueda con la secuencia en humanos de *LGI1* (NM005097) que se encontraba registrada en la base de datos del NCBI. Aquellas

Introducción

secuencias que contenían fragmentos del cDNA de *LGI1*, se utilizaron para llevar a cabo una segunda ronda de búsqueda de homólogos con el programa BLAT de la base de datos HGWD, y el programa BLASTN en la base de datos de Celera. Así, se determinó que *LGI2* humano, *LGI3* humano y *LGI4* humano, codificaban para unas proteínas de 545, 549 y 538 amino ácidos respectivamente. Según Gu y colaboradores, las tres nuevas proteínas presentaban idénticas estructuras comparadas con *LGI1*, esto es, con 4 repeticiones y media de secuencias ricas en Leucina (LRR) en el extremo N Terminal. Las repeticiones ricas en Leucina estarían flanqueadas por repeticiones ricas en Cisteína, presentando el motivo conservado CX₃CXCX₆C. Además, a excepción de la tercera LRR de *LGI4*, todas las secuencias ricas en Leucina de los tres parálogos presentarían una Fenilalanina en la posición 20, integrando también a estas nuevas proteínas en la familia F20 de las proteínas ricas en Leucina, familia donde estarían integradas también *LGI1*, Slit, Biglican y Osteomodulina. El porcentaje de similitud entre la secuencia de las 4 proteínas sería de un 61-72% entre el dominio extracelular, y un 62-72% entre el dominio intracelular predicho por Chernova y colaboradores {Chernova, 1998 #13}. La secuencia transmembrana {Chernova, 1998 #13} presentaría el porcentaje de homología más dispar, yendo del 75% hasta el 99% de homología. Comparando las secuencias de los 4 genes con sus correspondientes homólogos en ratón, encontraron un 97% de similitud en *LGI1*, 98% en *LGI2*, 97% en *LGI3* y 93% en *LGI4*.

En un estudio posterior, Staub y colaboradores {Staub, 2002 #3} utilizaron la secuencia del dominio en el extremo C Terminal de *LGI1*, al que redefinieron como dominio EPTP (Epitempina), para identificar nuevas proteínas que presentaran este dominio en su secuencia. Para ello utilizaron los programas PSI-BLAST y HMMER. En este trabajo, no sólo encontraron que *LGI2*, *LGI3* y *LGI4* presentaban este dominio en C Terminal, si no que la proteína VLGR, así como una proteína sin identificar (con número de entrada a la base de datos de Unigene Hs. 352217) también lo contenían. La proteína humana VLGR, que tiene

en su dominio extracelular 7 repeticiones de tipo EPTP, tiene localizado su gen en la región cromosómica 5q14.1, región asociada con las convulsiones febriles familiares de tipo 4. Además, su gen homólogo en ratón, *Mass1*, se encuentra mutado en el modelo de ratón de crisis audiogénicas Frings. Por otra parte, el cDNA de la proteína con número de entrada Hs. 352217, codificaría para una hipotética proteína con un dominio tipo trombospondina en su extremo N Terminal y 5 EPTPs en su extremo C Terminal, así que recibió el nombre de TNEP-1. Su gen está localizado en el cromosoma 21q22.3 cerca de la región crítica para el síndrome de Down. También encontraron repeticiones EPTP utilizando el programa TBLASTN en *Tetraodon nigroviridans* y *Danio rerio*, evidencia que sugiere que este dominio tendría una antigüedad mínima de 400 millones de años (minimum evolutionary age of 400 million years for the EPTP repeat). Con todas estas evidencias, Staub y colaboradores propusieron que el dominio EPTP definiría una superfamilia de proteínas que podrían estar implicadas en la epilepsia {Staub, 2002 #3}.

En este mismo trabajo y utilizando métodos de predicción de hélices transmembrana más sensibles {Moller, 2001 #52}, Staub y colaboradores {Staub, 2002 #3} no encontraron ninguna evidencia de que las 4 LGI presentaran un dominio transmembrana. Además, postularon que el nuevo dominio encontrado en el extremo C Terminal de los 4 parálogos, se plegaría formando una estructura *Beta propeller*, estructura que es incompatible con la presencia de un dominio transmembrana, y proponiendo así que las 4 proteínas fueran proteínas de secreción {Staub, 2002 #3}.

1.1.2.3.4.1. Localización genómica de la familia LGI

Haciendo una búsqueda con las secuencias de cDNA de las cuatro proteínas contra la base de datos de HGWD con fecha 22 de Diciembre de 2002, Gu y colaboradores {Gu, 2002 #6} determinaron que, LGI2 estaría localizado en

Introducción

el cromosoma humano 4p15.2, *LGI3* estaría localizado en el cromosoma humano 8p21.3 y *LGI4* estaría localizado en el cromosoma humano 19q23.33. A su vez, la localización de los genes en ratón sería, cromosoma 19 para *LGI1*, cromosoma 5 para *LGI2*, cromosoma 14 para *LGI3* y cromosoma 7 para *LGI4*.

1.1.2.3.4.2. Estructura genómica de la familia génica *LGI*

La organización genómica de *LGI2*, *LGI3* y *LGI4*, tanto en humano como en ratón, se dedujo a partir de la alineación de su correspondiente cDNA con sus correspondientes fragmentos genómicos {Gu, 2002 #6}. Alineando los cDNAs de las 4 proteínas, observaron que los 4 *LGI* tenían 7 intrones y éstos, estarían insertados en posiciones altamente conservadas tanto en humano como en ratón. Además, encontraron que *LGI4* presentaba un intrón extra en su extremo C Terminal, siendo el único de los 4 genes con un 9 exones en vez de 8 (Figura 6).

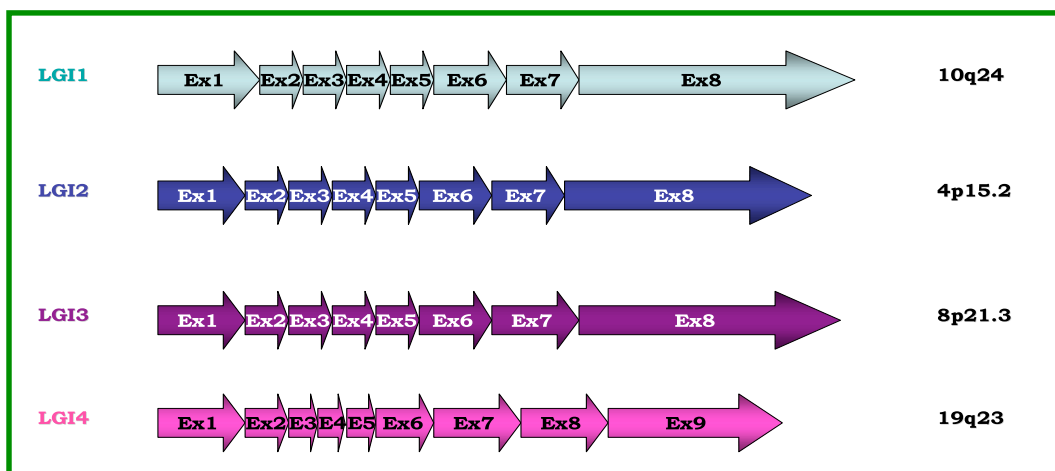


Figura 6. Estructura genómica y localización cromosómica de la familia de proteínas *LGI*. *LGI2* estaría localizado en el cromosoma 4p15.2, *LGI3* estaría localizado en 8p21.3 y *LGI4* en 19q23. *LGI2* y *LGI3* constarían de 8 exones, mientras que *LGI4* presentaría 9 exones.

1.1.2.3.4.3. Patrón de expresión de ARNm de la familia LGI

El patrón de distribución de expresión del ARN mensajero de los 4 LGI se determinó mediante PCR semi cuantitativa utilizando como molde, el cDNA de de 8 tejidos diferentes. Tanto LGI1 como LGI4 se expresaban en todos los tejidos estudiados, siendo su expresión más alta en el cerebro. LGI2 solo pudo ser detectada en cerebro, corazón y placenta y LGI3 también estaba presente en todos los tejidos, aunque la señal fue más intensa en cerebro y pulmones.

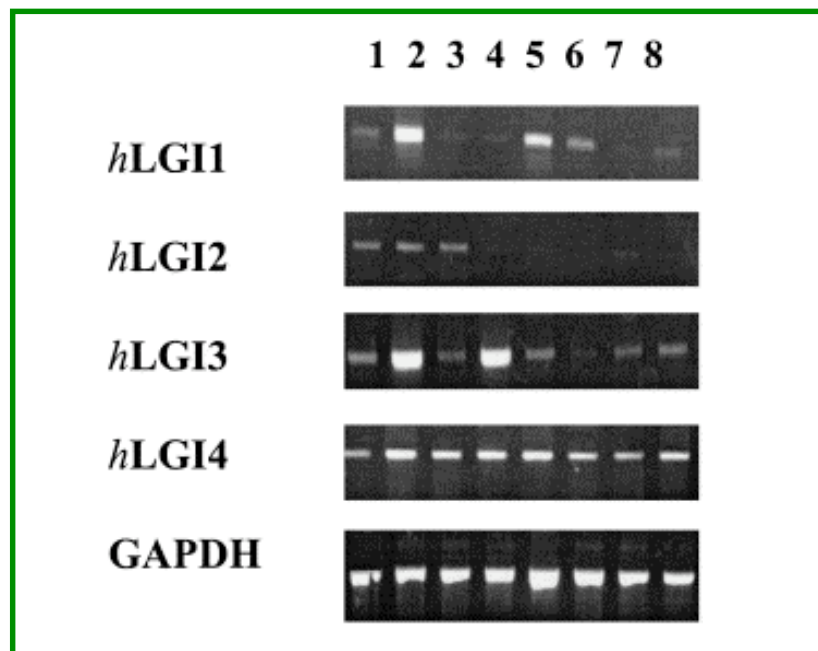


Figura 7. Patrón de expresión en diferentes tejidos de humano de los genes LGI1-LGI4 llevada a cabo mediante PCR semi cuantitativa. Calle 1; Corazón, calle 2; cerebro, calle 3; placenta, calle 4; pulmón, calle 5; hígado, calle 6; músculo, calle 7; riñón, calle 8; páncreas {Gu, 2002 #6}.

1.1.3.2.5 Función de la familia génica LGI

1.1.3.2.5.1 LGI1

Actualmente poco se sabe de la función de LGI1. Desde que se describiera en 1998 como gen supresor de tumores, han ido apareciendo diferentes trabajos en los que se le ha relacionado con varias funciones.

1.1.3.2.5.1.1 Gen supresor de tumores

En 1998, Chernova y colaboradores buscaban genes que estuvieran involucrados en la formación de tumores. Para ello, llevaron a cabo una estrategia de clonación de genes que hubiesen sido interrumpidos por traslocación cromosómica. La delección de un alelo entero del cromosoma 10q es un suceso común en glioblastomas, de manera que utilizando la línea de glioblastoma T98G, encontraron a LGI1 en el punto de ruptura de la translocación entre los cromosomas 10 y 19 $t(10;19)(q24;q13)$ que porta esta línea celular. Al estudiar su expresión, observaron que en gliomas malignos la expresión de LGI1 estaba prácticamente ausente y en gliomas de bajo grado la expresión se mantenía. LGI1 tiene su locus en el cromosoma 10q24, entre los genes PTEN/MMAC1 y DMBTI, genes que habían sido previamente descritos como genes supresores de tumores por el grupo de Lin y colaboradores {Lin, 1998 #75}. Con estos resultados y teniendo en cuenta la alta incidencia de la pérdida total del cromosoma 10 en los glioblastomas multiformes {Rasheed, 1992 #74; Rasheed, 1995 #73}, los autores concluyeron que LGI1 podría ser un gen supresor de tumores que estaría implicado en la progresión de tumores gliales {Chernova, 1998 #13}.

En esta línea de trabajo, Somerville y colaboradores llevaron a cabo una exhaustiva caracterización de la estructura intrón/exón de LGI1, así como de su promotor y el estado de metilación de la proteína {Somerville, 2000 #12}. La transcripción de ciertos genes supresores de tumores puede silenciarse por

metilación del promotor , u otros elementos reguladores que sean responsables del control de la expresión de los genes {Greger, 1994 #68}. Sin embargo, los autores no pudieron mostrar una relación entre diferentes estados de metilación de *LGI1* y la reducción que observaban en su expresión en los glioblastomas de alto grado.

Tampoco Brodtkorb y colaboradores pudieron encontrar una implicación directa de *LGI1* como un gen supresor de tumores con alta penetrancia {Brodtkorb, 2003 #14}. En su estudio, este grupo analizó el aumento de riesgo a padecer gliomas en aquellos pacientes que presentaban mutaciones en *LGI1*, y por tanto, epilepsia lateral temporal autosómica dominante. Está descrito que la presencia de mutaciones en la secuencia codificante del gen podría estar asociada a la inactivación de genes supresores de tumores. Sin embargo, Bordtkorb y colaboradores consideraron que mutaciones en *LGI1* por sí solas no son suficientes para formar un tumor{Brodtkorb, 2003 #14}.

Aún así, sí que se ha confirmado la reducción en los niveles de la proteína *LGI1* en gliomas. Besleaga y colaboradores realizaron estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo policlonal específico de *LGI1* sobre muestras de 40 tumores primarios en diferentes estados de evolución, y encontraron niveles elevados de proteína en gliomas de bajo grado, muy reducidos en gliomas de grado III y nulos en muestras de glioblastoma multiforme (grado IV) {Besleaga, 2003 #18}.

En conclusión, sólo dos hechos argumentan a favor de *LGI1* como un gen supresor de tumores: i) la disrupción del gen *LGI1* en la línea de glioblastoma T98G y ii) la baja o casi ausencia de expresión de la proteína *LGI1* en gliomas de alto grado y líneas celulares de glioblastoma multiforme. Teniendo en cuenta el modelo de dos hechos de Knudson {Knudson, 1971 #4}, un argumento menos cuestionable hubiese sido si se hubiera encontrado la pérdida o inactivación de

Introducción

las dos copias de LGI1. Sin embargo, no hay evidencias que indiquen que esto suceda, de manera que es improbable que LGI1 sea un gen supresor de tumores.

Según Gu y colaboradores {Gu, 2005 #42; Piepoli, 2006 #76}, la explicación de la reducción de la expresión de LGI1 en gliomas de alto grado sería muy sencilla. Un espécimen autópico de glioma, no sólo contiene células de glioma, si no que también contiene macrófagos, células endoteliales y células atrapadas de la estructura normal de cerebro como las neuronas. La fuente principal de LGI1 son las neuronas. Así, la expresión de LGI1 observada en los tumores primarios provendría realmente de las neuronas atrapadas en el tumor, y la disminución progresiva de expresión paralela al grado de evolución del glioma sería la consecuencia del desplazamiento o pérdida de estas neuronas a favor de las células tumorales que, al ser derivadas de la glía, expresarían niveles bajos o prácticamente nulos de LGI1 {Gu, 2005 #42; Piepoli, 2006 #76}. Esta interpretación estaría de hecho, apoyada por el trabajo de Besleaga y colaboradores, que encontraron menos células que expresaban LGI1 en gliomas de alto grado comparado a tumores de bajo grado {Besleaga, 2003 #18}. Además, en cerebro adulto los anticuerpos anti- LGI1 marcan neuronas pero no células gliales {Morante-Redolat, 2002 #7}

1.1.3.2.5.1.2 Gen supresor de metástasis

LGI1 codifica para una proteína de función todavía desconocida. En el extremo N terminal, LGI1 presenta 3 repeticiones ricas en Leucina (LRR) flanqueadas a ambos lados por secuencias ricas en cisteína. Estudios filogenéticos llevados a cabo por el grupo de Krex y colaboradores, concluyeron que debido a la alta homología de secuencia, podría haber una relación funcional entre las LRRs de LGI1, las proteínas de la familia TRK y la familia de proteínas SLIT, que se sabe están implicadas en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central {Krex, 2002 #8}. Con idea de contrastar esa hipótesis, Krex y colaboradores estudiaron el efecto de la reintroducción forzada de LGI1 en dos

líneas de glioblastoma con niveles reducidos y en dos líneas con niveles no detectables del gen endógeno. Sin embargo, ninguna de las 4 líneas infectadas mostró diferencias significativas en la capacidad proliferativa, el número de fase S del ciclo celular o la migración al comparar células expresando una construcción consistente en la ORF de *LGI1* seguida de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) y células expresando una construcción control GFP {Krex, 2002 #8}.

Siguiendo esta línea de trabajo, Kunapuli y colaboradores llevaron a cabo experimentos en los que sobre expresaban *LGI1* en dos líneas celulares que no presentaban expresión endógena de *LGI1* como son T98G y A172 {Kunapuli, 2003 #19; Kunapuli, 2004 #28}. La re-expresión forzada de *LGI1* redujo significativamente la habilidad proliferativa y migratoria de las células del glioma y una disminución en la tasa de crecimiento celular. Ensayos de invasión en una matriz BD de Matrigel demostraron que células de glioma que sobre expresaban *LGI1*, perdían su capacidad de migrar libremente a través de la membrana Matrigel. Además, llevaron a cabo el mismo experimento en otra línea de glioma, U87MG, que sí que expresa endógenamente *LGI1*. En este caso, la combinación de *LGI1* endógena y sobreexpresada no causó cambios significativos en la proliferación o habilidad migratoria de estas células, concluyendo que el tipo celular U87MG (como otros tumores) han debido desarrollar una ruta genética alternativa a su malignidad.

Para intentar entender esta reducción en la capacidad de crecimiento y habilidad migratoria en las líneas T98G y A172 después de ser transfectadas con *LGI1*, Kunapuli y colaboradores {Kunapuli, 2004 #28}, así como Piepoli y colaboradores {Piepoli, 2006 #76}, utilizaron los chip de genes Affymetrix (Santa Clara, California). Con ellos, compararon los perfiles de expresión de genes antes y después de la transfección con *LGI1*. Como consecuencia de la reexpresión de *LGI1*, se observó una expresión disminuida de genes relacionados con la matriz extracelular y de genes de la familia de las Metaloproteasas de Matriz

Introducción

Extracelular (MMPs), en concreto MMP1 y MMP3. Estas proteínas están estructural y funcionalmente relacionadas con las endopeptidasas dependientes de zinc que incluyen cuatro subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelinas y metaloproteasas transmembrana y son proteínas que se secretan al medio en forma de pro-MMPs activándose posteriormente por corte proteolítico {Nagase, 1999 #13}. Además, se ha sugerido que existe una relación entre altos niveles de estas proteínas y la capacidad invasiva de gliomas humanos, ya que las MMPs degradarían proteínas de matriz extracelular para poder filtrarse e invadir los tejidos circundantes {Nakada, 1999 #77}.

Dado que se conocía que la expresión de MMP1 y MMP3 está regulada por quinasas reguladas, a su vez, por las rutas de MAPK ERK 1/2 y p38, Kunapuli y colaboradores también analizaron el estado de activación de estas rutas en las células T98G transfectadas con LGI1. Como se muestra en **la figura8**, este grupo propuso que la reintroducción de LGI1 en células T98G promueve la fosforilación de AKT mediada por la PI3 quinasa, hecho que inhibe la cascada de MAPK Raf-MEK-ERK 1/2, reduciendo así y en última instancia la expresión de las MMPs. Estos resultados apoyarían el papel de gen supresor de metástasis, ya que su inactivación en células de glioblastoma eliminaría la inhibición sobre la producción de metaloproteasas de matriz extracelular implicadas en la elevada capacidad invasiva de los glioblastomas de alto grado {Kunapuli, 2004 #28}.

Sin embargo, también existen ciertas evidencias de que las MMPs desempeñen un papel durante el desarrollo del cerebro y migración neuronal {Del Bigio, 1999 #78}. Así, la disminución en los niveles de MMPs que se observan, después de transfectar las líneas celulares de gliomas con LGI1, podría estar sugiriendo que LGI1 contribuye a la susceptibilidad a padecer epilepsia afectando a la migración neuronal {Piepoli, 2006 #76}.

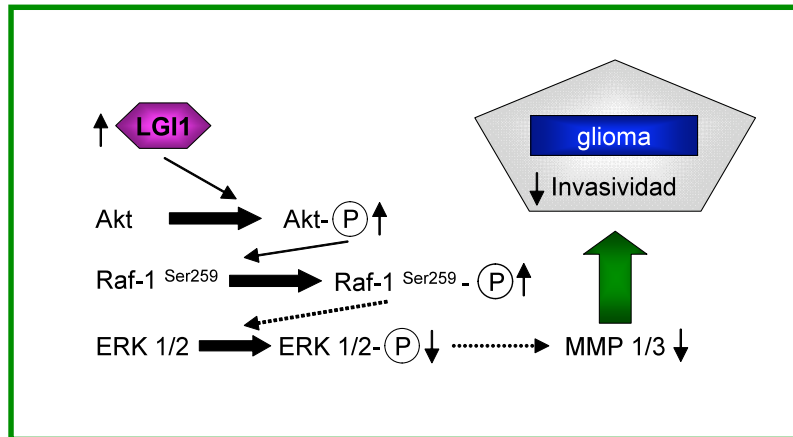


Figura 8. Modelo del efecto de la expresión forzada de LIG1 en líneas celulares de glioblastoma según Kunapuli {Kunapuli, 2004 #28}.

1.1.3.2.5.1.3 Proteína asociada al canal *Kv1.1*

Schulte y colaboradores han encontrado que LIG1 se encuentra asociado a la subunidad *Kv1.1* de los canales iónicos presinápticos dependientes de voltaje tipo A que modulan la transmisión sináptica en las neuronas del SNC {Schulte, 2006 #32}. El canal iónico de potasio *Kv1.1* se expresa a lo largo de todo el sistema nervioso, y especialmente en las membranas axonales. En estos canales, la inactivación está mediada por la subunidad Beta ($Kv\beta 1$), que se encargaría de actuar como una bola cerrando el poro, y evitando así, el intercambio de iones (Figura 9 A).

Utilizando un anticuerpo anti *Kv1.1*, Schulte y colaboradores fueron capaces de co-inmunoprecipitar LIG1, pasando por una columna extractos de membranas del cerebro de ratas. En el hipocampo, LIG1 y *Kv1.1* se ensamblarían con otras dos subunidades (*Kv1.4* y $Kv\beta 1$) las cuales poseen en su extremo N

Introducción

terminal dominios con capacidad para inactivar rápidamente el canal, fenómeno que se conoce como N inactivación. Para examinar los efectos de LGI1 en las propiedades eléctricas del canal, Schulte y col, expresaron Kv1.1 Kv β 1 y LGI1 en oocitos de *Xenopus*. En ausencia de LGI1, las corrientes que se registraron correspondían a un comportamiento típico canales presinápticos dependientes de voltaje tipo A. Sin embargo, cuando coexpresaron Kv1.1/Kv β 1 con LGI1 encontraron que la presencia de LGI1 en el complejo ralentizaba considerablemente el proceso de N inactivación debido a que LGI1 impedía a Kv β 1 ejercer su función (Figura 9B). Una vez vistos estos resultados, coexpresaron el canal con varias formas mutantes de LGI1 que causan epilepsia lateral temporal. En contraste con la forma silvestre, las mutaciones fueron incapaces de prevenir la inactivación de Kv1.1 mediante Kv β 1 (Figura 9C).

Para explicar la capacidad de LGI1 para acomplejarse y modular la cinética de inactivación de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo A, los autores propusieron un modelo en el que, en el hipocampo, cada subunidad Kv1.1 se uniría a una subunidad Kv β 1 y una subunidad de LGI1, estando esta unión directamente implicada en las propiedades eléctricas de las neuronas. Este modelo, y a pesar de que LGI1 no presenta una estructura típica de subunidad de canal iónico, establecería un posible mecanismo que explicaría la aparición de crisis epilépticas por mutaciones en LGI1 {Schulte, 2006 #32}.

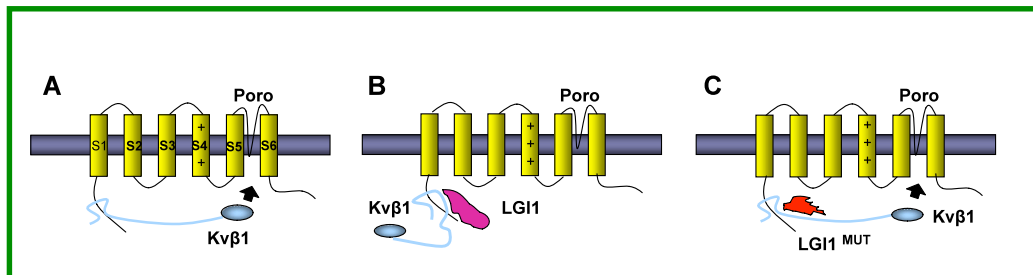


Figura 9. LGI1 previene la inactivación del canal Kv1.1 uniéndose a la subunidad Kvβ1. A) En los canales Kv1.1, el modelo de canal y bola está explicado por la subunidad Kvα1. B) La unión de LGI1 al canal, previene el acceso de la subunidad Kvα1 al poro, previniendo así la inactivación. C) Las mutaciones en LGI1 que causan ADLTE, no impiden a Kvα1 inactivar el canal. Figura adaptada de LK Kaczmarek {Kaczmarek, 2006 #79}.

1.1.3.2.5.1.4 Ligando de Adam 22

Recientemente, Fukata y colaboradores han propuesto a ADAM22 como el receptor de LGI1 {Fukata, 2006 #80}. ADAM22 es una proteína de membrana neuronal que está anclada en la cara externa de la membrana de neuronas postsinápticas mediante proteínas de citoesqueleto, entre las que se encuentran Stargazin y PSD-95 entre otras (Figura 10).

Fukata y colaboradores llevaron a cabo una búsqueda de proteínas que interaccionaran con PSD95, inmunoprecipitando proteínas a partir extractos de cerebro de ratas. Los autores identificaron un complejo de proteínas que comprendería a *Stargazin*, LGI1 y ADAM22. Curiosamente mutaciones en estas tres proteínas causan distintos fenotipos de epilepsia {Snyder, 2006 #81}.

Los autores han demostrado que LGI1 se une selectivamente a ADAM22 en sitios sinápticos de la superficie de neuronas de cerebro de rata. De hecho, tratamientos de cortes de cerebro de rata con LGI1, aumentaron la neurotransmisión mediada por el receptor de AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-

Introducción

5-metil-4-isoxazol propiónico), subtipo de receptor que media la forma de neurotransmisión excitatoria más numerosa el cerebro. Esta acción se pudo prevenir tratando los cortes previamente con una forma soluble de ADAM22, indicando que la activación sináptica mediada por LGI1 depende de que ésta se una a ADAM22. Este ensamblaje es el primer ejemplo de que una proteína secretada por neuronas, LGI1, sea capaz de unirse a otra proteína que está localizada en la cara externa de las membranas postsinápticas como es AMPA22 {Fukata, 2006 #80}.

Según el modelo propuesto por Fukata (Figura 10), LGI1 se secretaría en forma de dímero desde una neurona presináptica y se uniría a 2 moléculas de ADAM22 en la superficie de una neurona postsináptica, aumentando la transmisión de señales sinápticas.

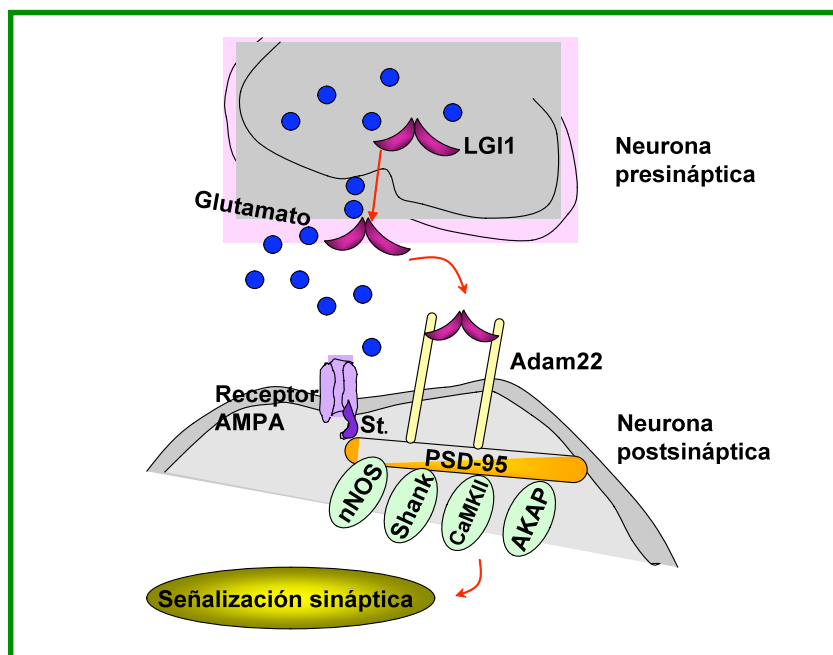


Figura 10. Transmisión sináptica y epilepsia. LGI1, se secretaría en forma de oligómeros por una neurona presináptica, y se uniría a ADAM22 en la superficie de una neurona postsináptica, aumentando la transmisión de señales sinápticas. La porción

intracelular de ADAM22 se une a PSD-95, proteína que está asociada con los receptores de AMPA y con múltiples proteínas que señalizan. St, Stargazin; nNOS, sintasa nítrico óxido neuronal; CaMKII, kinasa calcio calmodulina II; AKAP, proteína de anclaje kinasa A. Figura adaptada de Snyder et al., 2006().

1.1.3.2.5.2 LGI4

La mielinización es un proceso por el cual algunas fibras nerviosas adquieren mielina durante su desarrollo. La mielina es una membrana rica en lípidos y proteínas que actúa eléctricamente como un aislante y permite una conducción saltatoria rápida de los impulsos nerviosos. En el sistema nervioso central (SNC), este proceso está coordinado por los oligodendrocitos y sus interacciones con los axones. En el sistema nervioso periférico (SNP), las células que forman mielina son las células de Schwann {Garbay, 2000 #66; Edgar, 2004 #65}.

Recientemente, se propuesto a LGI4 como una proteína que desempeñaría un papel en el desarrollo del sistema nervioso periférico (SNP) {Bermingham, 2006 #46}. Una mutación espontánea en el laboratorio de Jackson en una cepa de ratón C57BL/6-ob, causa a estos animales, llamados ratones *claw paw*, un fenotipo de hipomielinización en el sistema nervioso periférico y posturas anormales de la cintura. No presentan, sin embargo, signos de desmielinización en el sistema nervioso central. Para entender los mecanismos moleculares por los cuales esa mutación espontánea causaba ese fenotipo, Bermingham y colaboradores llevaron a cabo una estrategia de clonaje posicional y encontraron, que el fenotipo de hipomielinización está causado por una inserción de 225 pb en el gen LGI4, que a su vez causa un corte proteolítico alternativo dentro del exón 4. Este nuevo procesamiento LGI4^{clp} codificaría para una proteína de tamaño 513 aa mientras que la proteína LGI4 codificaría para una proteína de 537 aa.

Introducción

Clonando ambas construcciones en vectores de expresión en células de mamífero, los autores demuestran que la proteína LGI4 se secreta al medio extracelular, mientras que la proteína mutante LGI4^{clp} se queda retenida. Los autores proponen que LGI4 realiza su función una vez secretada al medio, y el fenotipo claw paw resulta de la pérdida de función de LGI4.

Incubando cultivos celulares de ganglio dorsal de rata (DRG) homocigotos para la mutación clp (^{clp}/^{clp}- DRG) con medio condicionado de células CHO que sobreexpresan LGI4, consiguen recuperar el defecto en la mielinización que presentaban. Con estos resultados proponen a LGI4 como una proteína que controla la formación de mielina en el sistema nervioso periférico (SNP).

2 Hipótesis y objetivos

LGI1 es el primer gen descrito que no codifica para un canal y cuyas mutaciones causan epilepsia. Para llegar a este resultado, nuestro grupo partió de un estudio genético con 12 familias que sufrían epilepsia lateral temporal autosómica dominante. De las 12 familias, sólo 3 presentaron mutaciones en el gen LGI1.

Dado el desconocimiento que existía, al comienzo de este trabajo, sobre la función del gen LGI1, nos propusimos caracterizar la función de LGI1. Además, se postuló la hipótesis de que la familia génica LGI estuviera implicada en la aparición de epilepsia. El hecho de que LGI4 estuviera localizado en la región cromosómica 19q13.12, muy próximo al gen SCN1B (cuyas mutaciones causan epilepsia generalizada con crisis febriles +), así como que los cuatro genes compartieran una homología estructural tan alta, nos llevó a plantearnos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la implicación de los genes parálogos en la aparición de ADLTE
2. Caracterizar la función de LGI1

3 Material y Métodos

3.1 Genotipaje de los genes LGI2, LGI3 y LGI4

Para este estudio se recogieron muestras de aquellas familias que mostraban un fenotipo clínicamente compatible con ADLTE {Morante-Redolat, 2002 #7}. Las familias fueron diagnosticadas de acuerdo al criterio clínico establecido para la identificación de ADLTE, esto es, modo de transmisión de la enfermedad compatible con una herencia autosómica dominante, al menos dos miembros de cada familia presentaban una semiología que indicaba un origen de las crisis en el lóbulo lateral temporal (auras auditivas, crisis afásicas), un examen neurológico normal y ausencia de cualquier tipo de patología estructural en el cerebro. Estas familias no presentaban mutaciones en el gen LGI1, ni ligaban con el cromosoma 10q24.

Utilizando este criterio, se seleccionaron 12 familias, 7 de las cuales tenían origen vasco, 4 eran de origen italiano y 1 era de origen alemán {Ayerdi-Izquierdo, 2006 #53}.

Además, se recogió una muestra de 38 italianos pacientes afectados por epilepsia lateral temporal LTE, que tampoco presentaban mutaciones en LGI1. Estos pacientes fueron diagnosticados según el criterio utilizado en el trabajo y se compararon con una población control de 82 cromosomas italianos.{Bisulli, 2002 #2}.

Para determinar si alguna de las variantes encontradas en cualquiera de los genes parálogos era patogénica, se seleccionaron 60 cromosomas control de origen vasco y 60 cromosomas control de origen no vasco. Debido a que no existe ninguna evidencia genética de que la población española sea genéticamente diferente a la alemana o italiana, se utilizó la muestra control no vasca como control de las familias italianas y alemana.

Material y métodos

3.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el método de “salting out” {Miller, 1988 #54} a partir de 5ml de sangre periférica recogida en tubos con EDTA.

Se centrifugó la muestra de sangre completa durante 20 min a 2000 xg a T^a A. Se desechó el suero por aspiración y se recogió la interfase que contenía las células blancas, a las que se les añadieron 2 volúmenes de solución de lisis [0,144 M NH₄Cl; 1 mM NaHCO₃]. Se agitó violentamente el tubo y se volvió a centrifugar la muestra durante 40 min 2000 xg. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le añadieron 20ml de solución de lisis. Se centrifugó la muestra durante 30 min a 1500 xg con freno y se volvió a eliminar el sobrenadante. Se repitieron estos tres últimos pasos dos veces y finalmente se resuspendió el pellet en el líquido residual utilizando el *vortex*. Al pellet resuspendido se le añadieron 3,5 ml de lisis de leucocitos [10 mM Tris-HCl pH8,2; 0,4M NaCl; 2 mM Na₂EDTA pH 8] con 100 µl de proteinasa K (8 mg/ml) y se incubó cada muestra durante 2h a 50 °C.

Pasadas las dos horas, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se le añadieron 1,27 ml de acetato amónico 7,5 M para la precipitación de las proteínas. Se guardó la muestra a 4 °C durante la noche y al día siguiente se centrifugó a 3220 xg a 4 °C durante 60'. Se recogió el sobrenadante resultante y se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto para la precipitación del ADN. La “medusa” de ADN se enrolló con una pipeta Pasteur de punta doblada (fabricada a la llama para tal efecto) y se lavó con etanol al 70 %. Se dejó secar a T^o A la pipeta con el ADN enganchado en ella y una vez seco, se resuspendió el ADN en 300 µl de TE [Tris HCl 10 mM, pH8; EDTA 1 mM pH 8]. Por último, las muestras se dejaron en agitación rotatoria a 4 °C toda la noche.

3.1.2 Amplificación de ADN mediante PCR

LGI2 es un gen localizado en el cromosoma 4p15.2 y consta de 8 exones. LGI3 está localizado en el cromosoma 8p21.3 y consta de 8 exones y LGI4 se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.12 y tiene 9 exones.

Los cebadores fueron diseñados con el programa Generunner (<http://generunner.com>) siguiendo las siguientes secuencias del Ensembl: LGI2 (ENST00000282970), LGI3 (ENST00000306317) y LGI4 (ENST00000310123). Los diferentes cebadores y condiciones se encuentran recogidos en las tablas x,x y x. En todos los casos se amplificaron 50 pb de región intrónica a cada extremo del exón. Las condiciones de amplificación fueron: una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización de 30 s a 95 °C, una etapa de *annealing* de 30 s a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores (ver tabla X) y una etapa de extensión de 45 s a 72 °C. La reacción se concluyó con una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Una vez el producto amplificado, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2%, y una vez comprobado el tamaño, se purificaron mediante el kit *Qiaquick PCR purification* (Qiagen) y se secuenciaron utilizando la técnica de dideoxinucleótidos marcados en un secuenciador ABIprism Big Dye v3.0 (Applied Biosystems).

Material y métodos

Tabla 3: Cebadores y condiciones de PCR para el rastreo de mutaciones en el gen LGI2

<i>E</i>	<i>Cebador directo</i>	<i>Cebador reverso</i>	<i>T_m</i>
1	AGTGCTGATGTCAGGCAG	CAGAGGCAACTCCCTCG	TD6050
2	TGTGCTATGCCTCACTCCT	CACGGAGCTGGGGTACT	55°C
3	TGTTTGCCACAGATCAAA	ACCCTTGCAGAGATGCT	60°C
4	TGGGATACTAAGGAGAGA	CAGCCAAGAAACAGAGA	TD6050
6	TGAGAGTGACAGGGCATG	CGAGAGGGGATTGAAA	55°C
7	ACAAAACATGTCAGACAC	TTCACCTTTCCCCAGTCT	55°C
8	GTGATGATGGAACGGTGA	CCGAGCTCTCCCTCAAT	60°C

E: número de exón, T_m: temperatura del ciclo de *annealing* en la PCR
 TD6050 hace referencia a un protocolo de tipo touchdown en el que la temperatura de *annealing* desciende 0,5°C/ciclo desde 60°C hasta alcanzar 50°C

Tabla 4: Cebadores y condiciones de PCR para el rastreo de mutaciones en el gen LGI3

<i>E</i>	<i>Cebador directo</i>	<i>Cebador reverso</i>	<i>T_m</i>
1	CGCGCTCCGCTCTTCTCTC	TCTCGGCCTCCTCTC	TD6050
2	GAGGAGAAGGGAAAGACA	CTCTGTCCACTCTCCCT	55°C
3	AGTCATGTCTTGGGGAAG	ATCCACTCCCTACCCAGT	60°C
4	ACACGGGCTGAAATCTAG	CCATCCCAATTCTGAC	TD6050
6	CTTGACCAGCTCTATTTCT	GGGGTTTCGTGTCTGT	55°C
7	TAAAGCAACCACCATCAC	TACAGGAACTCAATGG	55°C
8	CAAGTTTGGGAAGGGACTG	CCTAGGCACTGAGATC	60°C

E: número de exón, T_m: temperatura del ciclo de *annealing* en la PCR
 TD6050 hace referencia a un protocolo de tipo touchdown en el que la temperatura de *annealing* desciende 0,5°C/ciclo desde 60°C hasta alcanzar 50°C.

Tabla 5: Cebadores y condiciones de PCR para el rastreo de mutaciones en el gen LGI4

<i>E</i>	<i>Cebador directo</i>	<i>Cebador reverso</i>	<i>T_m</i>
1	AAAGACGGAGAAGAGGAG	CTCCTGAGATCCTGATG	TD6050
2	GAAGGTTCTGGTTGCAA	AATGCCACCTGACATC	55°C
3	ATGCACATACTCACACCTG	TTCGCCATTTTTATCAAC	TD6050
4	CAGTGGCCTATGTCTT	AAGAAAAATACGTAAGA	TD6050
6	ATCTCTGGGGACACTTGC	GAGTGAGACGAGCCTCT	55°C
7	CATTTAGAGATGTAGGCA	AGTGGCTTGCAGGACAC	55°C
8	TTCTGCCTGTCCAGCAG	AGGTCAGAGTTTAGAGG	60°C
9	CTTCTGCTTCCAAGCTGT	CATCACCCCAAGTAGGG	58°C

E: número de exón, T_m: temperatura del ciclo de *annealing* en la PCR
 TD6050 hace referencia a un protocolo de tipo touchdown en el que la temperatura de *annealing* desciende 0,5°C/ciclo desde 60°C hasta alcanzar 50°C

3.1.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar el ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) fundida en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) [Tris-Borato 45mM, EDTA 1mM pH 8] con 0,5 \square g/ml de bromuro de etidio. Las muestras de ADN se prepararon con tampón de carga [azul de bromofenol al 0,25% (p/v), cianol de xileno al 0,25% (p/v), glicerol al 30% (v/v)]. En todos los geles se incluyó una calle de marcadores de ADN 1 kb (Fermentas, España)

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal OWL () en tampón TBE 0,5X. El voltaje empleado durante la electroforesis varió dependiendo del tamaño de los geles. Se empleó una fuente de alimentación Power Pac 300 de Bio Rad (Hercules, PA, EEUU). Los geles se registraron y analizaron con un analizador de imágenes KODAK Digital Science (Kodak, MA, América)

3.1.4 Análisis de los cambios en las muestras controles

El análisis de los cambios identificados en la familia génica de LGI en la población control se llevó a cabo mediante 2 técnicas. Se utilizó el ensayo de RFLP siempre y cuando existiera una diana de restricción en nuestro cambio, y en los casos en los que una digestión enzimática no era factible, se trabajó con un sistema de amplificación refractaria (ARMS). En la tabla 7 se muestra en detalle las técnicas empleadas para genotipar la población control para cada cambio identificado en las familias afectadas de ADLTE.

Material y métodos

Tabla 6. Técnicas y cebadores empleados para estudiar cada cambio identificado

Gen	Cambio	Experimento ^o	Cebador sentido ^o	Cebador reverso ^o	Tm ^d
LGI2	c.341+18 T>C	ARMS	TGTTTGCCACAGATCAAAA	CCGAATGTTTCAGCGAATAGAIG	60°C
LGI3	c.442+60 A>C	<i>Bsr</i> DI	ACACGGGCTGAAATCTAG	CCATCCCAATTCTGACTC	55°C
LGI4	c.242+47 A>G	ARMS	CCCACACATGTGCATAACIT	AATGCCCACCTGACATCT	F1:60°C* F2:56°C*
	c.456T>C (p.H151H)	<i>Eco</i> 72I	CAGTGGGCCTATGTCTTT	AAGAAATACGTAAGAACCA	50°C
	c.834G>C (p.P278P)	<i>Eco</i> O109I	TTCTGCCTGTCCAGCAG	AGGTCAGAGTTTAGAGGCTT	55°C
	c.960C>G (p.A320A)	<i>Bst</i> UI	TTCTGCCTGTCCAGCAG	AGGTCAGAGTTTAGAGGCTT	55°C
	c.1203A>G (p.T401T)	ARMS	GCTTCGAGAGACGCACGIA	TAGGTCAGAGTTTAGAGGCTT	60°C
	c.1395GC>AT (p.Q.L464,465Q,L)	<i>Alu</i> I	CTTCTGCTTCCAAGCTGT	CATCACCCAAGTAGGG	55°C

Cada posición polimórfica ha sido nombrada con respecto a la secuencia referencia que aparecen en la página de ENSEMBL (www.ensembl.org), siendo LGI2 (ENST00000282970), LGI3 (ENST00000306317) y LGI4 (ENST00000310123).

3.1.4.1 RFLP

Los cambios que generaban o eliminaban una diana enzimática, fueron estudiados amplificando por PCR el exón en cuestión, y después digiriendo las muestras con el enzima correspondiente, utilizando el protocolo recomendado por la casa comercial. Una vez digeridas, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2%, junto al marcador de peso molecular correspondiente. Aquellas restricciones que daban lugar a fragmentos que se diferenciaban en muy pocas pares de bases, se separaron en un gel en de acrilamida y se revelaron posteriormente con plata.

3.1.4.2 ARMS

Los cambios que no generaban ni eliminaban una diana enzimáticas, fueron estudiados mediante un sistema de amplificación refractaria. Este sistema se basa en la especificidad del cebador con la secuencia, de manera que se diseñaron para cada cambio un par de cebadores en los cuales la última base era específica del polimorfismo. En todos los casos se hicieron 2 reacciones de PCR para cada cambio y muestra, manteniendo siempre un cebador común (TABLA 6).

Una vez hecha la reacción de PCR, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2%.

3.2 Análisis estadístico

Los cambios encontrados en la población ADLTE, fueron analizados estadísticamente en comparación con la muestra control vasca o no vasca, dependiendo del origen de la familia. Así, las familias de origen vasco fueron comparadas con la población control vasca y, el resto de las familias, ya que no existen evidencias de que la población española sea diferente a la italiana o alemana, fueron comparadas con la población control no vasca.

Los 38 pacientes italianos de LTE fueron comparados con 82 cromosomas control de origen italiano.

El análisis estadístico utilizado fue t student.

Material y métodos

3.3 Material biológico

3.3.1 Cepas bacterianas

E.coli DH 5 α F-, \square 8odlacZ \square M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, \square (*lacZYA-argF*)U169, \square -

3.3.2 Líneas celulares de mamífero

Hek 293 T: Línea celular de riñón embrionario humano. Se cultivan en medio básico DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), con 10% de FBS (suero bovino fetal), 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 0,1 mg/ml estreptomicina a 37 °C y 5% de CO₂.

PC12: Línea celular del feocromocitoma adrenal de rata. Se cultivan en medio básico DMEM, con 6% de DHS (suero de caballo) y 6% de BCS (suero de calf), 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 0,1 mg/ml de estreptomicina a 37 °C a 5% de CO₂.

COS 7: Línea celular de riñón de mono. Se cultivan en medio básico DMEM, con 10% de FBS, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 0,1 mg/ml estreptomicina a 37 °C y 5% de CO₂.

OLN93: Línea celular precursora de oligodendrocitos de rata. Se cultivan en medio básico DMEM, con 10% de FBS, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 0,1 mg/ml estreptomicina a 37 °C y 5% de CO₂.

3.4 Protocolos específicos de células de mamífero

3.4.1 Construcciones

3.4.1.1 Clonación direccional por PCR o subclonación

Obtención del inserto (ORF que se desea clonar)

En caso de poseer el gen ya clonado en un vector que contiene dianas de restricción flanqueantes compatibles con el vector destino en el que se desea clonar, el procedimiento se denomina subclonación. En este caso, el inserto se obtiene mediante digestión a partir de 10 µg del plásmido del que queremos extraer el inserto, realizando una digestión doble si los enzimas son compatibles con el mismo tampón de reacción o secuencial purificando la reacción entre la primera digestión y la segunda. Las digestiones se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante del enzima de restricción incubando los 10 µg de DNA con al menos 1 unidad de cada enzima en el tampón recomendado a la temperatura adecuada durante más de 2h. La totalidad de la reacción de digestión se visualiza en un gel de agarosa del 0,8-1% teñido con Bromuro de Etidio recuperándose el DNA recortando con un bisturí el fragmento de agarosa que contiene la banda correspondiente al inserto y purificándola con el sistema *MiniElute Gel Extraction Kit* de Qiagen que permite concentrar la muestra eluyendo en 10 µl.

Cuando las dianas de restricción que flanquean el inserto en el plásmido origen no son compatibles con el plásmido destino o cuando no se dispone del inserto clonado en ningún vector, se puede obtener el inserto por PCR a partir de una genoteca o de un plásmido con el gen clonado, utilizando cebadores específicos del gen que contengan colas con la secuencia de las dianas de restricción necesarias para la clonación en el vector destino. La reacción de PCR se efectúa con una DNA polimerasa que posea prueba de lectura (actividad exonucleasa 3'→5') como la *Pfu Turbo* de Stratagene según las especificaciones

Material y métodos

del fabricante: 2,5 unidades de Pfu Turbo en tampón de reacción 1x, mezcla de los cuatro dNTPs (ATP, CTP, GTP y CTP) a una concentración final de 200 μ M cada uno, 0,5 μ M de cada cebador y 50 ng de DNA molde en un volumen de reacción de 50 μ l. Las condiciones de amplificación generales son las que especifica el fabricante de la polimerasa con 30 ciclos en los que la temperatura de *annealing* de los cebadores es habitualmente 60 °C y la temperatura de extensión 68 °C ajustando la duración de la extensión por ciclo según el tamaño del inserto (1min/kb). La totalidad de producto de PCR se visualiza en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio recuperándose el DNA recortando con un bisturí el fragmento de agarosa que contiene la banda de interés y purificándolo con el sistema *Qiaquick Gel Extraction Kit* de Qiagen. Una vez purificado el producto de PCR que ya contiene las dianas de restricción necesarias se somete a digestión con los enzimas correspondientes tras lo que se purifica y concentra mediante el sistema *MiniElute Reaction Purification Kit* de Qiagen, eluyendo en 10 μ l.

Obtención del vector destino

El vector dónde se quiere clonar el inserto ha de ser digerido con los mismos enzimas que el inserto para conseguir la clonación direccional del mismo. La digestión se efectúa como se ha expuesto en el punto anterior a partir de 10 μ g de vector y realizando digestión doble si la compatibilidad de tampones entre los enzimas y la separación entre las dianas de restricción en el Sitio de Clonación Múltiple lo permite. Tras la digestión los extremos 5'-Fosfato del vector se han de defosforilar para prevenir la religación del vector vacío. Para esto se incuba el vector digerido con 5 unidades de fosfatasa alcalina (Roche) en el tampón suministrado durante 30 min a 37°C. En último lugar la reacción se purifica y concentra con el sistema *MiniElute Reaction Purification Kit* de Qiagen.

Estimación de la cantidad de inserto y vector

Ambos productos se cuantifican comparando la intensidad de banda al correr 1 µl de los productos digeridos y purificados en un gel de agarosa al 0,8% con un patrón de peso molecular en el que se conoce la cantidad de DNA presente en cada banda (REAL, Durviz).

Ligación y Electroporación

La ligación del vector y del inserto digerido se llevan a cabo con el sistema de Roche *Rapid DNA Ligation Kit* durante 15 minutos a T^aA combinando vector e inserto en una relación molar de 1:3 en un volumen final de reacción de 21 µl en presencia de los tampones suministrados por el fabricante y 1 unidad de ligasa T4. Tras la ligación, el producto se purifica el sistema *High Pure PCR Purification Kit* de Roche eluyendo la columna con 100 µl de agua. Para su propagación y posterior purificación el producto de la ligación se transfiere a células competentes de *E. coli DH5α* mediante electroporación a 1700 mV con 10 µl de la ligación purificada, creciendo el cultivo resultante en placas de medio LB agar [1% Bactotripton, 1% NaCl, 0,5% Extracto de levadura, pH 7, 2% agar] suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección de colonias positivas portadoras de la nueva construcción (100 mg/l si es ampicilina y 50 mg/l si es kanamicina).

Purificación del DNA plasmídico

Algunas colonias individuales crecidas en las placas con el antibiótico de selección se crecen de manera independiente en medio LB líquido suplementado con antibiótico a 37°C en agitación durante 8-12 horas. Para la comprobación de la ligación por análisis de restricción y/o por secuenciación directa, el DNA plasmídico se purifica a pequeña escala con un sistema comercial de Miniprep (Qiagen, Eppendorf, Marligen). Una vez comprobado que la nueva construcción está correctamente clonada, se selecciona la escala de purificación de DNA

Material y métodos

plasmídico en función de las necesidades de cada experimento: a media escala: *Midiprep* con el sistema comercial de Marligen o a gran escala *Maxiprep* con el sistema comercial de Eppendorf o *Megaprep* con el sistema JetStar de Genomed.

3.4.1.2 Vectores de expresión

- **pEGFP.N1 (Clontech):** este vector de expresión en eucariotas fusiona la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C terminal de la proteína.
 - Marcador de selección en bacterias: kanamicina
- **pFlag:** este vector de expresión en eucariotas fusiona la etiqueta Flag en el extremo C terminal de la proteína. Se trata del vector pEGFP.N1 modificado mediante ingeniería genética, sustituyendo la secuencia GFP por la secuencia del epítipo Flag.
 - Marcador de selección en bacterias: kanamicina
- **pc3.1AP6:** este vector fusiona la proteína de la fosfatasa alcalina de placenta humana (AP) en el extremo N terminal de la proteína. Se trata de un plásmido modificado cedido por la Dra. Alyson Fournier (*Montreal Neurological Institute- McGill University*)
 - Marcador de selección en bacterias: ampicilina
- **pFc:** este vector fusiona la proteína de las cadenas ligeras de las IgGs (Fc) humana en el extremo N terminal. Se trata de un plásmido modificado cedido por el Dr. Phil Barker (*Montreal Neurological Institute-McGill University*).
 - Marcador de selección en bacterias: ampicilina

3.4.1.3 Cebadores utilizados para la clonación de las construcciones

3.4.2 Métodos de transfección

A fin de aumentar la eficiencia de transfección, las células HEK 293T se transfectaron mediante el método de fosfato cálcico, y las células PC12 y COS 7 se transfectaron por lipofección.

3.4.2.1 Transfección por fosfato cálcico

El día anterior a la transfección se sembraron $1,3 \times 10^6$ células HEK293T por placa de cultivo de 10 cm de diámetro, una por cada reacción de transfección que se quería realizar. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta el día siguiente, comenzando el protocolo de transfección cuando el cultivo alcanzara el 60-70% de confluencia.

Para cada reacción de transfección se preparaba un tubo tipo eppendorf en el que se añadieron, primero una dilución de 5-10 µg de cada uno de los plásmidos que se quería transfectar simultáneamente en un volumen final de 540 µl de agua estéril. Sobre esta dilución añadían gota a gota 600 µl de tampón HBS2x [280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄·2H₂O, 50mM HEPES, pH 7,05] y sobre esto 60 µl, también gota a gota, de 2M CaCl₂. Tras 20 min de incubación a T^aA durante el que se forman los precipitados de fosfato cálcico, se

Material y métodos

mezclaba cuidadosamente el contenido del tubo con la pipeta y se distribuía gota a gota sobre la placa de cultivo. Las células se incubaron durante 8-24 h antes de cambiar el medio de cultivo por medio fresco, tras lo que se incubaron hasta alcanzar el nivel de expresión de la construcción transfectada necesario. Las condiciones de cultivo (medio y tiempo de incubación) variaron según la aplicación pero, en general, 24h tras el cambio de medio era suficiente para encontrar niveles detectables de proteína.

3.4.2.2 Transfección por liposomas (lipofección)

El día anterior a la transfección se sembraron 2×10^5 células (COS7) o 5×10^5 células (PC12) por pocillo en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ hasta el día siguiente, comenzando el protocolo de transfección cuando el cultivo alcanzara el 60-70% de confluencia.

Para cada reacción de transfección se prepararon 2 tubos tipo eppendorf. En uno se añadieron 250 µl de medio bajo en suero (OptiMEM I) y 10 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carisbad, CA), y en el otro tubo se añadieron 250 µl OptiMEM I y 8 µg de ADN. Una vez hecha cada mezcla por separado, se añadió el contenido del tubo con ADN al tubo que contenía el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carisbad, CA). Esta mezcla se dejó incubar durante 20 minutos para que se formaran los lipocomplejos. Durante los 20 minutos de espera, se lavaron dos veces las células con 1 ml de OptiMEM I. Después de los dos lavados, a las células se les añadió 1,5 ml de medio OptiMEM I, al cual se le añadieron después los 0,5 ml de reacción de lipocomplejos gota a gota. Así el volumen final de la transfección por pocillo fue de 2 ml. Las células se incubaron durante 5 horas. Pasado este tiempo, el medio de las células fue cambiado por el medio de cultivo de cada tipo celular.

3.4.3 Procesado de muestras de los cultivos transfectados

Las células HEK 293T transfectadas se incubaron durante 24 horas tras el cambio a medio completo. Transcurrido este tiempo, se procesaron por separado el medio y las muestras (lisados) celulares.

Las células PC12 transfectadas se diferenciaron durante 48 horas con factor de crecimiento neuronal NGF (50 ng/ml) (mNGF, 2,5S Promega). Transcurrido este tiempo, se procesaron por separado el medio y los lisados celulares.

3.4.3.1 Medio de cultivo

Para obtener la muestra de proteína a partir del medio de cultivo, se recogió el medio de cada placa y se suplementaron con una mezcla de inhibidores de proteínas (Complete, Roche). A continuación se filtró cada medio por separado, con un filtro de 0,2 μ m, y se concentraron 20 veces en unidades de centrífuga de corte 30 kDa (Millipore). Una vez tuvimos los medios concentrados, al volumen restante de medio se le añadió tampón de carga SB2X y se los medios se analizaron por SDS-PAGE.

3.4.3.2 Lisados celulares

Para la obtención del lisado celular, se llevó a cabo primero un lavado de la placa con PBS+ frío [1,9 mM NaH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 154 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , pH 7,4]. Después, manteniendo las placas sobre hielo, se retiró el PBS+ frío y se añadió a cada placa 1 ml de tampón de lisis NP40 [10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40] suplementado con 1% de Tritón X-100 y cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Tras 5 minutos de incubación en hielo, se pasaron las células a un tubo tipo eppendorf (previamente rotulado) y se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 40 s. Después, y para clarificar la muestra, se centrifugaron a 1500 xg durante 15 min a

Material y métodos

4 °C. Los sobrenadantes se pasaron a un tubo limpio. Para analizar la expresión por *Western blot* se tomaron 50 μ l de cada lisado combinado con 50 μ l de tampón de carga SB2X.

3.4.4 Coimmunoprecipitación

Para esta técnica se utilizaron células HEK 293T transfectadas por el método de fosfato cálcico. Sin embargo, las células se transfectaron en vez de con 10 μ g de un único ADN, con 2 plásmidos diferentes utilizando 5 μ g de cada uno. En todos los experimentos se utilizó la misma estrategia para comprobar interacciones; coexpresamos una de las proteínas de interés con etiqueta Flag, inmunoprecipitando la proteína con Flag con un anticuerpo policlonal anti-Flag (Sigma), mientras que los niveles de la proteína coimmunoprecipitada se detectaron con el anticuerpo específico de la etiqueta de la otra proteína de interés (Fc o GFP).

14 horas después de la transfección, se cambió el medio a las células HEK 293T por medio completo [DMEM, 10% FBS, 2mM Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 0,1 mg/ml Estreptomicina]. Ese mismo día, por la tarde, se puso a incubar el anticuerpo que íbamos a usar para inmunoprecipitar nuestras proteínas con una solución de bolas de proteína sepharosa- G (Amersham Biosciences, Inglaterra). Para cada reacción de inmunoprecipitación se mezclaron 50 μ l de suspensión de bolas de proteína G (pre equilibradas en tampón NP40), 5 μ l del anticuerpo con el que se iba a inmunoprecipitar y 1 ml de tampón NP40. Esta mezcla se incubó a 4 °C y en agitación rotatoria toda la noche.

Al día siguiente se llevó a cabo la coimmunoprecipitación. Para la obtención del lisado celular se llevó cabo el protocolo explicado anteriormente. Mientras se obtenía el lisado, se lavaron y repartieron las bolas sepharosa-G preincubadas con el anticuerpo. Se centrifugó la mezcla original, de bolas Sepharosa-G y anticuerpo hecha el día anterior, a 1500 xg durante 45 s. Se retiró el máximo tampón posible

sin arrastrar bolas y se volvió a añadir la misma cantidad de tampón NP40 que había al comenzar. Se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió un par de veces. Tras retirar el segundo lavado, se añadió un volumen de tampón que nos permitió repartir la suspensión poniendo cantidades iguales en tubos tipo eppendorf de 1,5ml (previamente rotulados y habiendo uno por cada placa). Tras el último lavado, se centrifugaron los tubos tipo eppendorf y se retiró parte del tampón, dejando las bolas sepharosa-G en un volumen de 100 μ l.

50 μ l de cada lisado se mezclaron 50 μ l de 2xSB. Se hirvieron a 100 °C durante 10 min y se guardaron en el congelador hasta el momento de cargarlos en el gel.

El resto de los lisados se transfirieron a los tubos que contenían las bolas Sepharosa-G y el anticuerpo. Se mezclaron por inversión hasta que el pellet se disgregó y se incubaron durante 2 horas a 4°C y en agitación rotatoria.

Tras las dos horas se hicieron dos lavados con tampón NP40 frío y no suplementado. Para hacer los lavados primero se centrifugaron las muestras a 4°C y a 1500 rpm durante 1 minuto. Se aspiró el máximo tampón posible sin arrastrar bolas y se añadió 1ml de tampón NP40 frío. Se mezcló por inversión y se incubó en agitación a 4°C durante 5 minutos. Así se repitió tres veces y en el último lavado se retiró el máximo tampón posible. Se añadió finalmente 60 μ l de 2xSB al pellet de las bolas y se le dio un vórtex para mezclar bien.

Se hirvieron las muestras y se cargaron en un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes.

3.4.5 Detección de proteínas mediante SDS-PAGE y Western blot

Para comprobar la expresión de las proteínas en cultivos celulares de mamífero, se efectuó electroforesis vertical en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posterior transferencia a membranas de

Material y métodos

nitrocelulosa para la detección con anticuerpos (*Western blot*). A continuación se detalla el protocolo general utilizado para estas técnicas.

Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas según su tamaño molecular, se prepararon geles de poliacrilamida polimerizando monómeros de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Genaxis) a distinto porcentaje (8-12%) en función del tamaño de la proteína a detectar. Los geles se polimerizaron en presencia de persulfato amónico y TEMED (N, N, N', N'-tetrametilendiamina) (Genaxis) y SDS 10% que consigue una carga negativa uniforme en las proteínas desnaturizadas haciendo que se separen al aplicar un campo eléctrico exclusivamente en función de su masa. El método utilizado fue el de la electroforesis discontinua de Laemmli según el cual el gel de poliacrilamida está constituido por una región inicial denominada "Gel Empaquetador" (*Stacking*) polimerizado en tampón Tris-HCl a pH 6,8 en el que las mezcla de proteínas en tampón de carga SB [0,3 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 50% glicerol, 5% β -Mercaptoetanol y 0,2 mg/ml Azul de Bromofenol] se concentran en un espacio mínimo y una región denominada "Gel Separador" (*Resolving*) polimerizado en tampón Tris-HCl a pH 8,8 en el que las proteínas se separan en función de su tamaño molecular. El extracto de proteínas mezclado con tampón de carga SB se desnaturizó durante 10 min a 100 °C justo antes de someterse a la electroforesis que se realizó a voltaje constante (120 V) en tampón de Laemmli [Tris 3,03% (p/v) y glicina 14,4% (p/v), 0,1% SDS (p/v), pH8,3], que se preparó 10 veces concentrado y se almacenó a temperatura ambiente.

En todos los geles se incluyó una calle en la que se analizó patrones de proteína de baja masa molecular (Prestained Standard, BioRad, Hercules, EEUU).

Las condiciones empleadas fueron de 90V durante 30 minutos seguidas de 100V durante 90 minutos. Se utilizó una fuente de alimentación Power Pac 300 de Bio Rad (Hercules, PA, EEUU).

Western Blot

Tras separar las muestras de proteína mediante SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron por la técnica del *Western blot*. Se utilizó el método de transferencia por inmersión a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL de Amersham) en tampón de transferencia [20mM Tris, 150 mM glicina y metanol 20%(v/v)].

Las proteínas se electrotransfirieron a las membranas a 60V y 300 mA y 4°C durante 1 hora, empleando un equipo de transferencia de Bio Rad (Hercules, PA, EEUU). Entre los electrodos de carbón del equipo se colocaron tres papeles 3MM de Whatman (Maidstone, Reino Unido) empapados en tampón de transferencia, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otros tres papeles 3MM.

Posteriormente se comprobó la eficiencia de la transferencia de las proteínas mediante tinción reversible con rojo Ponceau [0,5% Rojo-Ponceau (Sigma), 1% ácido acético glacial (Merck)] que se eliminó mediante un lavado con TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1% *Tween-20*] en agitación.

Tras la transferencia, la membrana se lavó con tampón de TBS-T y se bloqueó con tampón de bloqueo [10% (p/v) leche descremada en TBS-T] durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios monoclonales se añadieron al tampón de bloqueo (a la dilución recomendada por la casa comercial) durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 h a 4°C. Tras lavar la membrana varias veces con TBS-T, se incubó con anticuerpos secundarios policlonales conjugados a HRP (a una dilución 1/5000 (v/v) en todos los casos)

Material y métodos

durante 1h 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana con TBS-T, se realizó el revelado con una solución de ECL (Amersham Biosciences, EEUU).

Inmunodetección

En la tabla XXX se especifican los distintos anticuerpos utilizados con sus correspondientes diluciones.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas de fusión por *Western blot* en células de mamífero.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa Comercial
Primarios			
anti- Flag (M2)	Ratón	1:1000	Sigma
anti- Flag	Conejo	1:100	Sigma
anti-GFP	Conejo	1:1000	Invitrogen
anti-Fc	Conejo	1:5000	Jackson
anti ERK2 (C14)	Ratón	1:500	Santa Cruz
anti pERK (E4)	Conejo	1:100	Santa Cruz
Secundarios			
anti-ratón ^{HRP}	burro	1:5000	Jackson
anti-conejo ^{HRP}	burro	1:500	Jackson

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)

3.4.6 Estudio de glicosilación

Mediante el programa informático NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) se predijeron 3 sitios de glicosilación para LGI1 (Sierrol-Piquer et al., 2006), 4 sitios de glicosilación para LGI2, 2 sitios de glicosilación para LGI3 y 1 sitio de glicosilación para LGI4. Para el estudio del estado de N-glicosilación de LGI2 y LGI3 se llevó a cabo una digestión con PNGasa F.

La PNGasa F es una amidasa que hidroliza el residuo más interno de GlcNAc del oligosacárido unido a la asparragina (Asn o N) de la proteína (N-oligosacárido).

El tratamiento con esta enzima se llevó a cabo con lisados celulares provenientes de una transfección con fosfato cálcico en HEK293T y e inmunoprecipitados con anticuerpo anti Fc. Estos lisados inmunoprecipitados se resuspendieron en 25 μ l de tampón de desnaturalización 1X suministrado por el fabricante. Las muestras fueron desnaturalizadas a 100°C durante 10 min y digeridas con 4 mU de PNGasa F (New England Biolab) a 37°C durante 90 min. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.4.7 Producción de medios condicionados

En este trabajo se utilizaron células HEK 293T para producir medios condicionados. Por medio condicionado se entiende un medio de cultivo en el que se ha mantenido creciendo un cultivo de células de manera que, en el medio, se van acumulando factores secretados producto del metabolismo de esas células. En concreto, se puede conseguir un medio enriquecido de una proteína, si el cultivo se transfecta con una construcción que contenga una proteína con capacidad de secretarse. Como la transfección supone una sobreexpresión de la proteína exógena introducida, el medio condicionado resultante se encuentra enriquecido con la proteína de interés, aunque también se acumulan en el medio, factores secretados por el metabolismo natural de las células en cultivo.

Se obtuvieron medios enriquecidos con las proteínas AP (células transfectadas con pc3.1AP6 vacío), AP-LGI1 (células transfectadas con pc3.1AP6 LGI1-^{PS}), Flag (células transfectadas con pFlag vacío), LGI1-Flag (células transfectadas con pFlag LGI1) y medio transfectado sin ADN (medio control). Para ello se plaquearon $1,2 \times 10^6$ células HEK 293 en medio DMEM [DMEM, 10% FBS, 2mM Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 0,1 mg/ml Estreptomina] por cada placa de 60 cm². Al día siguiente se transfectaron las células por el método de fosfato de calcio y al día siguiente se retiró el medio de las placas y se sustituyó por 10ml de medio DMEM completo [DMEM, 10% FBS, 2mM Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 0,1 mg/ml Estreptomina]. 24 horas más tarde se hizo un

Material y métodos

lavado de 5ml a cada placa con DMEM sin suero [DMEM, 2% (v/v) P/S, 2mM Glut, 1mM aminoácidos esenciales] para retirar todo el resto de suero posible, y se incubaron las células durante 48 horas en 10ml del mismo medio sin suero.

Pasados los dos días, se recogió todo el medio y se desecharon las placas. Para impedir que los posibles restos celulares colmataran las unidades de filtración Amicon Ultra YM-30 (Millipore), se filtraron previamente todos los medios con filtros de 0,45 μm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Una vez filtrados, los medios se concentraron en una centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a una velocidad máxima de 3220 xg. A modo de estimación, se tardó en concentrar unas 4 horas cada 100 ml de medio.

Una vez concentrados los medios, se volvieron a filtrar, esta vez en condiciones estériles (en campana y filtros de 0,25 μm), y se guardaron a 4°C hasta su uso.

La concentración de proteína existente en los medios AP y APLG1 se estimó de acuerdo a Flanagan {Flanagan, 2000 #63; Flanagan, 2000 #64}. Se midió la actividad AP añadiendo el sustrato *p*-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma, St. Louis, MO, EEUU), que se convierte en un producto amarillo cuya absorbancia puede medirse a 405 nm. La actividad se midió por el cambio de absorbancia a 405nm en una placa de 96 pocillos utilizando el lector de placas tipo Victor (Perkin Elmer, Canadá). Para llevar a cabo la medida, se hicieron tres réplicas por muestra a dos tiempos diferentes $t = 1 \text{ min}$ y $t = 5 \text{ min}$. Se pipetearon 5 μl de cada medio condicionado y se añadieron 50 μl de sustrato por pocillo. Al cabo de 1 minuto, se paró la reacción de las réplicas para el $t = 1 \text{ min}$ con 100 μl de NaOH 1 M. Al cabo de 5 minutos se paró la reacción de las réplicas para el $t = 5 \text{ min}$. Una vez hecha la medida de absorbancia a 405nm, se estimó la cantidad de proteína mediante el cálculo propuesto por Flanagan {Flanagan, 2000 #63; Flanagan, 2000 #64} :

$$\left(\frac{(\text{OD}/\text{min} \times 40)}{1000}\right) / 60000 \times 10000000$$

Las unidades de la concentración para esta fórmula fueron de nM.

3.4.7 Ensayos de unión a la superficie celular (“AP Binding”)

Esta metodología descrita por Flanagan y colaboradores {Flanagan, 2000 #63; Flanagan, 2000 #64} permite detectar la capacidad de unión a la membrana de un determinado ligando que se fusiona a la fosfatasa alcalina. Se llevaron a cabo estudios de este tipo para determinar si AP-LGI1 era capaz de unirse a la superficie celular de células Pc12 diferenciadas a fenotipo neural mediante tratamiento de las mismas con Factor de Crecimiento Nervioso (NGF).

Las PC-12 son un tipo celular que normalmente crece en suspensión, así que para evitar que durante el ensayo se despegaran, las placas se trataron previamente con poli-D-Lisina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) en relación 1:2. Después de 1 hora de tratamiento a temperatura ambiente, se lavaron las placas tres veces con agua para retirar los restos de poli-D-Lisina y se dejaron secar.

El ensayo de unión se llevó a cabo de dos maneras diferentes según se deseara obtener un resultado cualitativo mediante tinción de las células positivas para la unión o un ensayo cuantitativo para medir la intensidad de la unión.

Ensayos “AP Binding” cualitativo

Una vez tratadas las placas con poli-D-Lisina, se plaquearon 5×10^5 células PC-12 por pocillo en placas de 6 pocillos (10cm^2) en su medio correspondiente [DMEM, 6%BCS, 6% DHS, 2mM Glutamina, 2% (v/v) P/S]. Al día siguiente se sustituyó el medio por DMEB [DMEM, 0.1% BSA, 2%(v/v)P/S, 2mM Glut] y se añadió NGF (50ng/ml) (mNGF, 2,5S Promega). Al día siguiente se volvió a sustituir el medio por DMEB y NGF (50ng/ml) incubando las células un total de 48hrs en NGF.

Material y métodos

Para el ensayo cuantitativo, se determinó trabajar con una concentración estimada de APLGI1 de 15nM en un volumen final de 2ml de medio DMEB por pocillo de 10cm². Primero, las células diferenciadas se lavaron una vez con PBS 1X. Después, se añadieron los 2ml de DMEB conteniendo 15nM de medio condicionado APLGI1 o medio condicionado AP por pocillo y se incubaron las placas durante 1 hora y media a T^oA. Pasados los 90 minutos, se lavaron las placas 3 veces con solución HBAH muy fría [Hanks Balanced SALT Solution, 20mM HEPES, 0,1% azida sódica y 0,5mg/ml BSA] . Después se lisaron las células con 150 µl de tampón de lisis [20mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1% Tritón x100 y cocktail de inhibidores de proteasas]. Para inactivar la actividad endógena de la fosfatasa alcalina, se incubaron las muestras a 65° durante 15 minutos. La concentración de proteína total se determinó según Bradford (1976) empleando seroalbúmina bovina como proteína patrón. A una muestra de 5µl se le añadieron 225 µl de un reactivo comercializado por Bio-Rad (Hércules, PA, EEUU). La absorbancia se midió a 595nm.

Una vez normalizadas las cantidades de proteína, la unión de AP-LGI1 y AP a la superficie celular se determinó utilizando *p*-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma, St. Louis, MO, EEUU) como sustrato y midiendo la absorbancia a 405nm.

Ensayos “AP Binding” cuantitativo

Para poder hacer capturas fotográficas al microscopio de esta unión, las células PC-12 fueron diferenciadas como en el anterior ensayo y tratadas con el medio condicionado AP LGI1 o AP de la misma forma. Después del tratamiento con los medios condicionados, la actividad fosfatasa alcalina endógena fue inactivada durante 90 minutos a 65° y se añadió 1ml del sustrato NBT [nitro blue tetrazolium, (0,33mg/ml)] y BCIP [5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (0,17mg/ml)] (Sigma, St.Louis, MO, EEUU) para el revelado. Este reactivo es

sensible a la luz, de manera que el revelado se llevó a cabo en la oscuridad y a temperatura ambiente. El revelado se paró lavando las muestras con 1 ml de tampón salino fosfatado (PBS) 1X- 10mM EDTA. Las fotos se tomaron 24 horas después de haber parado la reacción en un microscopio Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Dependencia de dosis

Dado que AP-LGI1 se unía a la superficie celular de las células PC-12 diferenciadas, se realizó un ensayo de dependencia de dosis. Para ello, se realizó un experimento en el que se añadieron cantidades crecientes de medio condicionado AP-LGI1 (5nM, 10nM, 20nM, 40nM) y medio condicionado AP (5nM, 10nM, 20nM, 40nM) en células PC-12 diferenciadas con NGF (50ng/ml) (Promega, WI, EEUU) dejando que actuaran durante 90 min a T.A. El resto del protocolo prosiguió como el apartado anterior. Se añadió *p*-NPP como sustrato de la reacción y la absorbancia se midió a 405nm.

3.4.8 Ensayos del efecto del tratamiento con LGI1 sobre la ruta ERK1/2

Para este experimento se condicionaron medios con AP, AP-LGI1 y medio Mock (sin transfectar con ADN) y se diferenciaron las células PC-12 como queda explicado en el primer punto de este apartado. Se decidió trabajar con una concentración de medio condicionado AP-LGI1 de 15nM. El medio condicionado mock y el medio condicionado AP fueron concentrados las mismas veces que el medio condicionado AP-LGI1, de manera que la cantidad que se necesitó de medio AP-LGI1 para añadir 15nM en un volumen final de 2ml, fue la que se usó de medio condicionado AP para un volumen final de 2ml por pocillo de 10cm².

Material y métodos

Se incubaron las células durante 2 horas con 1ml de medio condicionado Mock por pocillo en el incubador a 37 °C. Después, sobre cada pocillo (y sin retirar el medio Mock) se añadió la cantidad correspondiente de medio condicionado AP-LGI1 para una concentración de 15nM y la misma cantidad de medio condicionado AP. Estos tratamientos duraron 15 minutos, 5 minutos y 2 minutos y se llevaron a cabo a 37 °C. Una vez transcurridos los tiempos determinados, se lavaron las células con solución salina en tampón fosfato 1X (PBS) y se les añadió 150 μ l de tampón de lisis RIPA [NaCl 1.5 M, NP40 1%, Deoxicolato 0,5%, SDS 1%, Tris 50mM pH 8] suplementado con inhibidores de proteasas y 1mM Ortovanadato. Los lisados se recogieron con la ayuda de un rascador y se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C a revolución máxima. Los sobrenadantes se pasaron a un tubo limpio y se determinó la concentración de proteína total según Bradford (1976), empleando seroalbúmina bovina como proteína patrón. A una muestra de 5 μ l se le añadieron 225 μ l de un reactivo comercializado por Bio-Rad (Hercules, PA, EEUU). La absorbancia se midió a 595 nm. Una vez normalizadas las cantidades de proteína, se cargó en geles de archilamida en condiciones desnaturalizantes 15 μ gr de cada muestra. Los geles se procesaron siguiendo el protocolo establecido para el *Western blot*.

Los anticuerpos primarios ERK (Sigma, MO, EEUU) y pERK (Sigma, MO, EEUU) se utilizaron según las recomendaciones de la casa comercial. El anticuerpo secundario burro anti conejo-HRP y burro anti ratón (Jackson, MN, EEUU) se utilizó también según las recomendaciones generales de la casa comercial.

Cuantificación de la disminución en la intensidad de bandas

Mediante el programa Multigauge V2.1, de Fujifilm, se determinó el porcentaje de disminución en los niveles de fosfo-ERK $\frac{1}{2}$. Se calculó la relación

entre la intensidad de las bandas de fosfo-ERK $1/2$ (pERK1 + pERK2) con respecto a las bandas de ERK total (ERK1 + ERK2) para cada muestra. Los resultados se representaron como porcentaje de la relación pERK $1/2$ y ERK $1/2$ comparada con el inicio del tratamiento ($t = 0$).

3.4.9 Purificación de Fc-LGI1

Se purificó proteína LGI1 unida a Fc a partir de medio condicionado obtenido de la transfección de células HEK 293T. Para ello, el día 0 se plaquearon $1,3 \times 10^6$ células HEK 293T por placa de 60 cm². El día 1 se transfectaron por el método de fosfato de calcio con 10 μ g de ADN del plásmido pFc-LGI1 que expresa la proteína LGI1 con Fc en posición N terminal. El día 2 se cambió el medio de las células por medio DMEM completo, y fue el día 3 cuando se cambió el medio a medio DMEM sin suero [DMEM, 100 U/ml Penicilina, 0,1 mg/ml Estreptomicina] y se dejó condicionar el medio durante 48 horas. Una vez pasadas los dos días, se recogió el medio de las placas de los cultivos celulares en un mismo tubo y éste se centrifugó primero y filtró después, para eliminar los posibles restos celulares que interfirieran en la purificación.

Se empaquetaron 1 ml de bolas Sepharosa proteína G (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) con 1 ml de bolas sepharosa proteína A (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) y Tris HCl 100 mM pH 7,4. Se lavó la columna con 10 ml de Tris HCl 100 mM pH 7,4 y se pasó el medio por la columna dos veces. Después, se lavó la columna con 10 ml de Tris HCl 100 mM pH 7,4 y se eluyó la proteína con 500 μ l de Glicina 100 mM pH 3. Al tubo donde se recogió cada fracción eluida, se añadieron 10 μ l de Tris 1 M pH 9, para que el pH final de la fracción fuera cercano a 8.

3.4.10 Ensayos de supervivencia celular en OLN93

Para este experimento se sembraron 5×10^5 células OLN 93 por pocillo, en placas de 96 pocillos, y se incubaron en medio básico sin suero [DMEM, 100 U/ml Penicilina, 0,1 mg/ml Estreptomina] durante 72 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Pasadas las 72 horas, se cambió el medio básico sin suero por diluciones seriadas de diferentes medios condicionados, esto es; medio enriquecido con LGI1 Flag (proveniente de células HEK 293T transfectadas con pFlag LGI1^{FL}), medio Flag (células transfectadas con pFlag), medio AP (células transfectadas con pc3.1 AP6), medio AP LGI1 (células transfectadas con pc3.1 AP6 LGI1^{FL}), medio Fc (células transfectadas con pFc), medio Fc LGI1 (células transfectadas con pFcLGI1^{FL}) y medio mock (células transfectadas sin ADN). 48 horas después del cambio de medio, se añadieron 10 μ l de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]. El MTT es un reactivo que se utiliza para medir la viabilidad celular en diferentes condiciones de cultivo. Este ensayo se basa en la propiedad del MTT de ser metabolizado por las mitocondrias de células vivas, siendo su producto el formazan. El MTT es de color amarillo pálido, mientras que el formazan es de color azul oscuro. Los cambios de absorbancia se miden a 495 nm y determinan la viabilidad celular del cultivo en cuestión. Las células OLN 93 se incubaron con el reactivo MTT durante 5 horas a 37 °C y se paró la reacción añadiendo 190 μ l de tampón de parada (0,04 N de HCl en isopropanol).

Inmunodepleción del medio condicionado

Para determinar si el aumento de la viabilidad celular era debido a la presencia en el medio condicionado de la proteína LGI1, o de alguna otra proteína secretada por las células HEK durante el condicionamiento de los medios, se decidió inmunodeplecionar el medio. Para ello, se incubaron bolas sepharosa proteína G (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) con anticuerpo anti Flag durante 2 horas a 4 °C. Después se incubaron las bolas Sepharosa proteína G-anti Flag con el medio condicionado LGI1 Flag y medio condicionado Flag

durante 4 horas a 4 °C en agitación rotatoria. Así la proteína LGI1 Flag se habría pegado a las bolas con el anticuerpo, y el medio se quedaría con menos cantidad de proteína. Después de la incubación del medio condicionado con el anticuerpo, se recogió el medio, se filtró y se hicieron diluciones. Se incubaron las células con las distintas diluciones. Si la viabilidad celular (comparada con los pocillos control) persistía, sería en parte debido a otras proteínas que se secretan al medio cuando las HEK 293T son transfectadas por el método de fosfato de calcio, ya que se determinó la presencia de LGI1 Flag y Flag, mediante *Western blot*, en las bolas de Sepharosa proteína G con el anticuerpo anti Flag.

3.5 Chip

Se trabajó con el chip comercial Panorama Anti-body Microarray Cell signaling (SIGMA, St Louis, EEUU). Este chip está diseñado para estudiar la expresión de proteínas en células o tejidos. Contiene 224 anticuerpos diferentes, estando cada uno de ellos por duplicado en el porta. Estos anticuerpos representan señales biológicas que incluyen; apoptosis, ciclo celular, neurobiología, citoesqueleto, transducción de señal y proteínas nucleares. Dada la poca y dispar información que existe actualmente sobre la función de LGI1, nos pareció adecuado trabajar con este chip que incluía tantas y variadas rutas celulares. La expresión de una proteína en el extracto celular o tisular, se detecta cuando esta proteína se une a su correspondiente anticuerpo. La unión se visualiza debido a que el extracto proteico celular se marca con un fluoróforo fluorescente.

Se decidió trabajar con células PC12 diferenciadas durante 48 horas con NGF. Con este chip, se quiso comparar la diferente expresión de proteínas en las condiciones en las que conseguimos ver una disminución en los niveles de ERK

Material y métodos

$1/2$ fosforilado consecuencia del tratamiento con AP-LGI1, frente a la expresión de proteínas cuando estas células se tratan con medio AP.

Para ello, se repitió el mismo experimento que en el apartado **Ensayos del efecto del tratamiento con LGI1 sobre la ruta ERK1/2**. Sin embargo, esta vez, los lisados celulares no se procesaron para ver la disminución de proteína en un Western blot sino para añadirse al chip. La extracción de los lisados celulares se llevó a cabo con 1 ml de tampón A (reconstituido con una mezcla de inhibidor de proteasas y fosfatas según el protocolo de la casa comercial). Se cuantificó la proteína mediante el método Bradford y una vez cuantificada, se marcó 1 ml de extracto celular (1 mg/ml) de la placa tratada con medio AP-LGI1 con el fluoróforo Cy3 y se marcó 1 ml de extracto celular (1 mg/ml) de la placa tratada con medio AP con el fluoróforo Cy5. Para el marcaje, se utilizó el kit Cy3 y Cy5 “Monofunctional Reactive Dye” (Amersham Biosciences) y se siguieron las instrucciones recomendadas por la casa comercial. Una vez marcada la proteína, se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford y se calculó el ratio molar de proteína marcada mediante la fórmula $D/P = \text{Concentración de Cy3 o Cy5} / \text{concentración de proteína de cada muestra}$, ya que se requieren valores $D/P > 2$ para trabajar con el chip.

La muestra control y la muestra sujeta a estudio se marcan con diferentes fluoróforos, en nuestro caso; la muestra tratada con AP (será nuestro control) con Cy5 y la muestra tratada con APLGI1 con Cy3. Se mezcló igual cantidad de proteína de cada muestra antes de aplicárselas al porta con los anticuerpos pegados y después se incubó el chip con nuestra mezcla de proteínas durante 45 minutos a temperatura ambiente y agitación leve constante. Una vez transcurridos los 45 minutos, se lavó y secó el chip y se llevó al servicio de lectura de arrays de la universidad de Valencia () para escanearlo.

El chip se realizó dos veces. Cada chip se trató como un experimento diferente. En cada chip, cada anticuerpo está por duplicado. Las dos veces el

extracto celular control se marcó con Cy5 y la muestra sujeta a estudio con Cy3. La intensidad de los puntos se midió con el programa MultiGauge v2.1. Cada valor se normalizó y los valores de expresión fueron transformados a logaritmo en base 2 como índice de cambio en la expresión génica (log Ratio). Este valor tiene la ventaja de producir un espectro continuo de valores y hace simétrica la escala de proteínas inducidas y reprimidas.

Se trabajó con aquellas proteínas cuyo $\log_2\text{Ratio}$ fue $\leq -0,75$ (en el caso de proteínas reguladas negativamente) y proteínas cuyo $\log_2\text{Ratio}$ fue $\geq 0,75$ (en el caso de proteínas reguladas positivamente).

4 Resultados

LGI1 se identificó como gen responsable de ADLTE a partir de una muestra de 12 familias afectadas con ese tipo de epilepsia. Como se ha comentado anteriormente, sólo se encontraron mutaciones en 3 de estas familias, de manera que disponíamos de 9 familias con un fenotipo clínico compatible con ADLTE y sin mutaciones en el gen LGI1. Además, en 5 de estas familias el ligamiento a 10q24 estaba excluido (Gorostidi-Pagola A 2004), sugiriendo que este síndrome pudiera presentar heterogeneidad genética.

El hecho de que LGI4 estuviera localizado en la región cromosómica 19q13.12, muy próximo al gen SCN1B (cuyas mutaciones causan epilepsia generalizada con crisis febriles +), así como que los cuatro genes compartieran una homología estructural tan alta, nos llevó a plantearnos la hipótesis de que fueran mutaciones, en alguno de los genes parálogos, los causantes de la enfermedad en el resto de familias afectadas.

Para comprobar que, efectivamente, los genes parálogos tenían una alta homología estructural, estudiamos los tres genes desde un punto de vista proteómico, analizando su arquitectura de dominios.

4.1 Arquitectura de dominios de las proteínas LGI2, LGI3 y LGI4

Mediante la herramienta informática SMART {Schultz, 1998 #60; Schultz, 2000 #61} (disponible en <http://smart.embl-heidelberg.de>) se realizó un análisis de la secuencia proteica de LGI2, LGI3 y LGI4 con el fin de identificar dominios conservados.

Como se aprecia en la **Fig 11**, el programa identificó en el N-term de las tres proteínas un péptido señal, 3 Repeticiones Ricas en Leucina (LRRs) y 1 Región rica en Cisteína que flanqueaba las LRRs por la derecha. El programa

Resultados y Discusión

también fue capaz de identificar en el extremo C-term el dominio EPTP {Scheel, 2002 #5} en las tres proteínas parálogas.

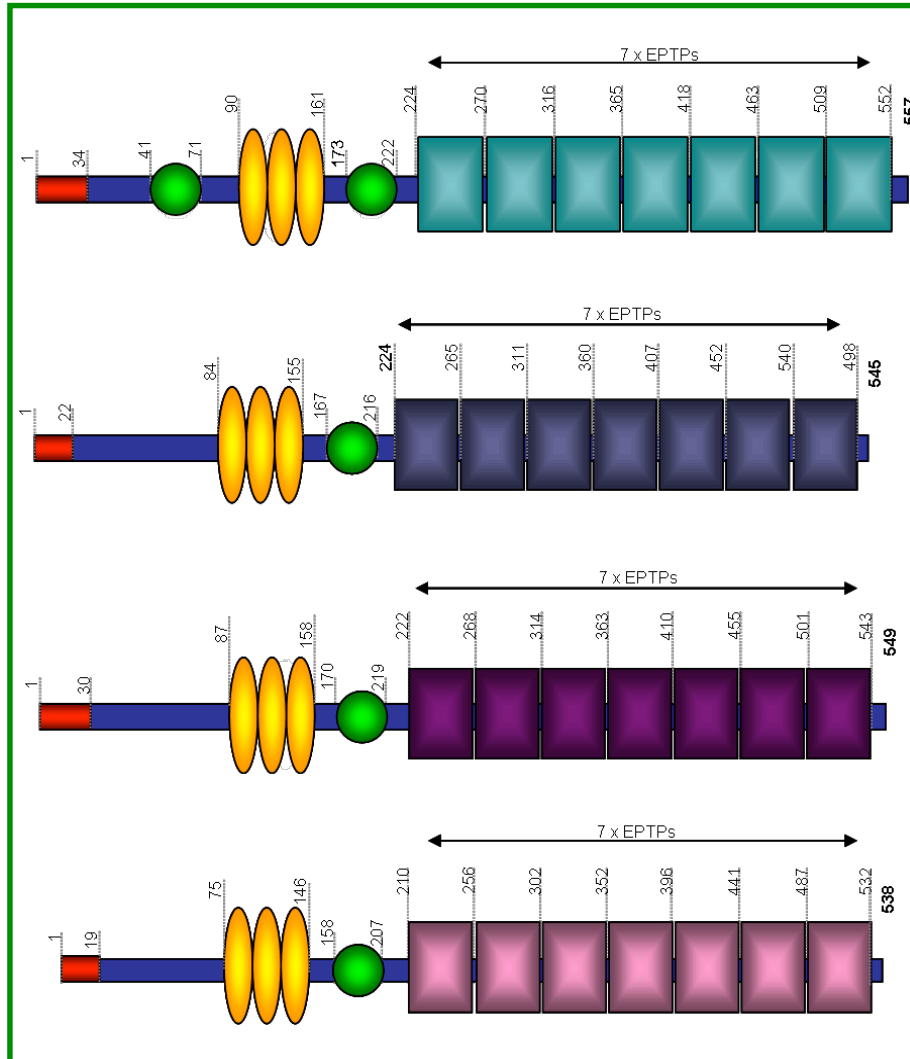


Figura 11. Arquitectura de dominios de LGI1, LGI2, LGI3 y LGI4. En la región N Terminal en rojo están los péptidos señal, en verde los dominios ricos en Cisteínas, en naranja las Repeticiones Ricas en Leucina (LRRs). En la región C terminal se encuentran las 7 repeticiones en tandem (EPTPs).

4.2 La Familia génica LGI codifica para proteínas que se secretan y glicosilan

Evidencias experimentales del laboratorio nos llevaron a determinar que LGI1 es una proteína glicosilada y que se secreta {Sirerol-Piquer, 2006 #89}. Para poder comprobar si los parálogos también eran proteínas de secreción y se glicosilaban, y debido a que no existían anticuerpos comerciales que las detectaran en *Western blot*, se clonaron LGI2 y LGI3 en el vector pFc. Este vector fusiona en pauta la etiqueta Fc en extremo N terminal, de manera que se puede detectar en *Western blot* utilizando un anticuerpo anti Fc. Por problemas técnicos fuimos incapaces de clonar LGI4.

Para determinar la localización de las proteínas, se transfectaron las construcciones en la línea celular HEK 293 (Fig 12). Después, por una parte se recogieron los medios celulares y se concentraron, y por otra parte se obtuvieron los lisados de las células. Las muestras fueron analizadas por *Western blot*. Como se observa en la figura 12, Fc-LGI1, Fc-LGI2 y Fc-LGI3 se secretan en HEK 293.

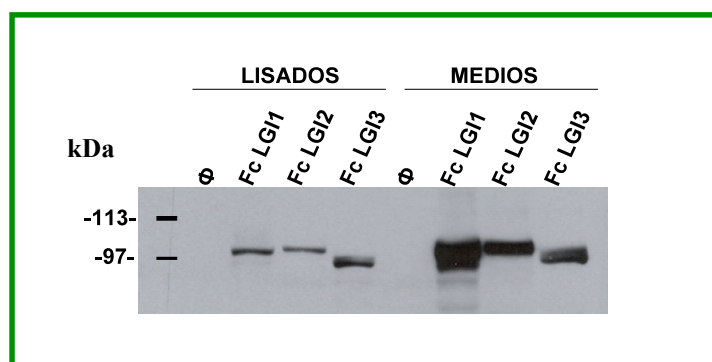


Figura 12. Secreción de LGI1, LGI2 y LGI3 al medio celular de HEK293 T. Se transfectaron LGI1, LGI2 y LGI3 fusionadas a Fc y se analizaron los lisados celulares (izquierda de la figura) y los medios celulares. Las tres proteínas se secretan al medio extracelular. El *Western blot* se reveló utilizando un anticuerpo monoclonal anti Fc (Jackson).

Resultados y Discusión

Gu y colaboradores mostraron mediante RT-PCR, que LGI1 y sus parálogos se expresan en neuronas {Gu, 2002 #6}. Para comprobar que esto realmente sucede, se analizó la expresión de las proteínas LGI2 y LGI3 en proteínas en células PC-12 diferenciadas a fenotipo neuronal mediante NGF. Para ello se llevó a cabo la misma aproximación experimental que en la línea celular HEK293. Se transfectaron las construcciones pFc-LGI1, pFc-LGI2 y pFc-LGI3 en células PC12 utilizando liposomas, y 5 horas después de la transfección se diferenciaron las células a fenotipo neuronal mediante tratamiento con NGF durante 48 horas. Después se analizaron los medios y los lisados celulares por *Western blot*.

La **figura 13** nos muestra que las tres proteínas son secretadas al medio independientemente del tipo celular. Proponemos, además, que esta aproximación experimental y por tanto su resultado, sería lo más cercano a lo que realmente sucede *in vivo*.

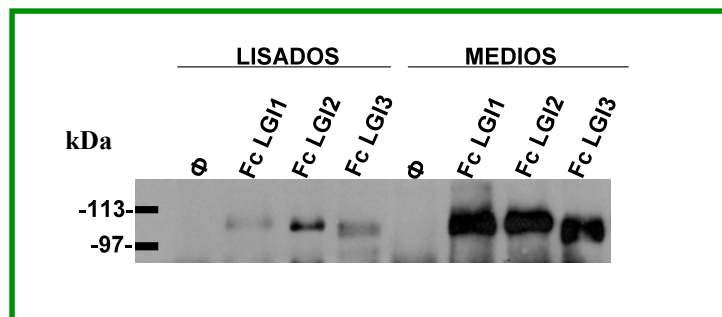


Figura 13. Secreción de LGI1, LGI2 y LGI3 en células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal. Se transfectaron LGI1, LGI2 y LGI3 fusionadas a Fc y se analizaron los lisados celulares (izquierda de la figura) y los medios celulares (derecha). Las 3 proteínas son secretadas al medio extracelular. El *Western blot* se reveló utilizando un anticuerpo monoclonal anti Fc (Jackson).

La mayoría de las proteínas de secreción están glicosiladas. De hecho, LGI1 presenta 3 sitios de glicosilación en p.N192, p.N277 y p.N422 {Sirerol-Piquer, 2006 #89). Para determinar si los parálogos de LGI1 también son proteínas glicosiladas, llevamos a cabo una predicción bioinformática mediante el programa Net NGlyc de la universidad de Dinamarca (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Introdujimos la secuencia completa de LGI1, LGI2, LGI3 y LGI4, y el programa predijo; para LGI1 los tres puntos de glicosilación que habían sido previamente demostrados por el grupo; para LGI2 4 sitios potenciales de glicosilación en las Asparraginas de las posiciones p.N70, p.N186, p.N271 y p.N402; para LGI3 2 sitios potenciales de glicosilación en las Asparraginas en posición p.N189 y p.N311 y para LGI4; un único sitio potencial de glicosilación en la Asparragina situada en p.N177 (Figura 14).

Resultados y Discusión

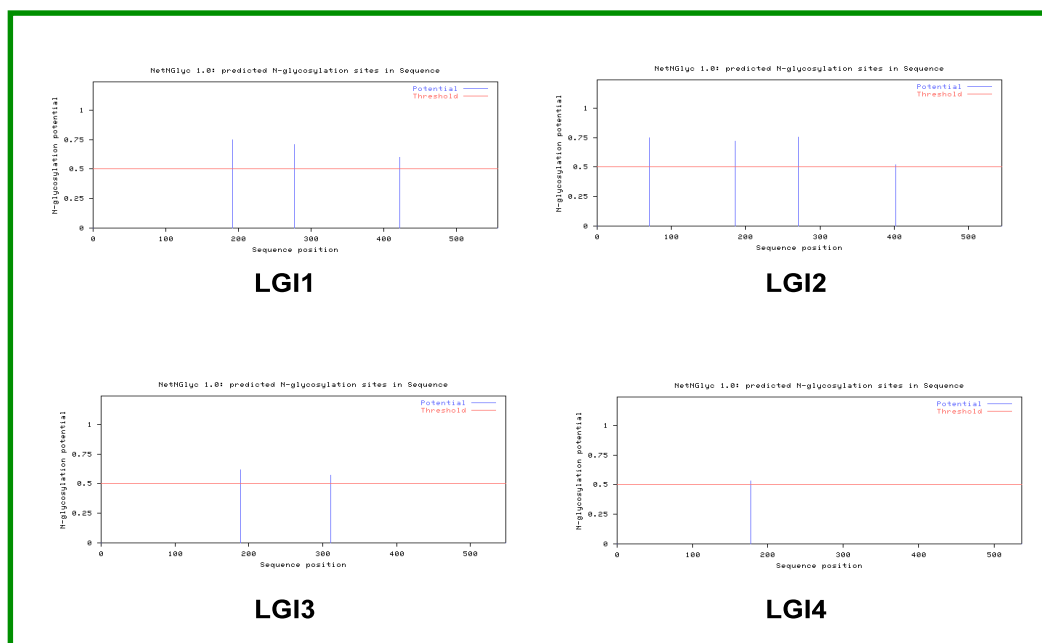


Figura 14. Predicción de los sitios de glicosilación de las proteínas LGI1, LGI2, LGI3 y LGI4. LGI1 está glicosilada en las Asparraginas de las posiciones 192, 277 y 422 {Sirerol-Piquer, 2006 #89}, LGI2 podría estar glicosilada en las Asparraginas posicionadas en los aa 70, 186, 271 y 402 , LGI3 en Asparraginas localizadas en los aa 189 y 311, y LGI4 en un única Asparragina localizada en el aa 177.

Para comprobar que realmente LGI2 y LGI3 se N-glicosilaban, se llevó a cabo un tratamiento con la enzima PNGasa F a los lisados celulares provenientes de una transfección transitoria de células HEK293T con las construcciones pFcLGI1, pFcLGI2 y pFcLGI3. Las muestras tratadas se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y *Western blot*. La [figura 15](#) muestra que efectivamente LGI2 y LGI3 son proteínas glicosiladas como había predicho el análisis bioinformático. Sin embargo, con este gel no se pudo resolver si el número glicosilaciones para cada proteína era el predicho por el programa.

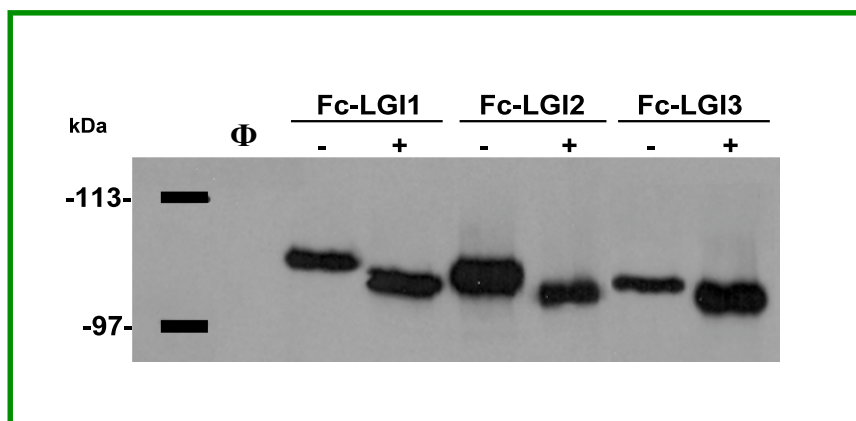


Figura15. LGI2 y LGI3 son proteínas glicosiladas. Se realizaron tratamientos con PNGasa F en los lisados de células HEK 293T transfectadas previamente con pFc-LGI1, pFc-LGI2 y pFc-LGI3. Las muestras se analizaron en un *Western blot* revelado con un anticuerpo anti Fc (Jackson). Para que la diferencia entre tamaños de banda fuera más visual, se sembró la muestra sin tratar (-) y la muestra tratada con la enzima (+) para cada una de las proteínas.

Como he mencionado anteriormente, no pudimos clonar LGI4. Varios grupos han comentado la inestabilidad que presenta LGI4 cuando está clonada en vectores {Senechal, 2005 #41; Bermingham, 2006 #46} de manera que pensamos que ese era nuestro problema. Sin embargo, Bermingham y colaboradores sí fueron capaces de clonarla y demostrar que se secreta y está glicosilada. Los resultados obtenidos por Birmingham apoyan nuestra conclusión de que la familia génica LGI es una familia de glicoproteínas que se secretan.

4.3 Búsqueda de mutaciones en los genes *LGI2*, *LGI3* y *LGI4*

Mutaciones en *LGI1* causan epilepsia lateral temporal {Morante-Redolat, 2002 #7} y *LGI1* se secreta y está glicosilada {Sierrol-Piquer, 2006 #89}. Dado que *LGI2* y *LGI3* se secretan y están glicosiladas, y que *LGI4* se encuentra localizada en la región cromosómica 19q13.12, muy próximo al gen *SCN1B* (cuyas mutaciones causan epilepsia generalizada con crisis febriles +), decidimos genotipar los 3 genes parálogos en aquellas familias que presentaban un fenotipo clínico compatible con ADLTE y no presentaban mutaciones en *LGI1*. Nuestro objetivo era determinar si mutaciones en los genes parálogos eran responsables de la aparición de la enfermedad.

La búsqueda de mutaciones en estos tres genes se realizó mediante secuenciación directa de la región codificante y parte de la región no codificante de *LGI2*, *LGI3* y *LGI4*. Se trabajó con dos tipos de muestra. Por una parte, se buscaron mutaciones en las 12 familias previamente descritas con fenotipo clínico compatible con epilepsia lateral temporal autosómica dominante y por otra parte, se trabajó con una muestra de 32 pacientes esporádicos con epilepsia lateral temporal, esto es, sin historia familiar afectada por este tipo de epilepsia.

Se trabajó con un caso *propositus* de cada una de las 12 familias afectadas con este tipo de epilepsia, es decir, se secuenciaron los exones y 100pb de cada intrón de cada uno de los 3 genes, de un miembro afecto por familia. De las 12 familias, 7 tenían origen Vasco, 4 origen Italiano y 1 única familia origen Alemán. Todas presentaban un fenotipo clínico compatible con ADLTE y no presentaban mutaciones en regiones codificantes de *LGI1*. De hecho, 5 de las familias Vascas, así como la familia de origen Alemán y las 4 familias de origen Italiano, participaron en el estudio gracias al cual nuestro grupo identificó a *LGI1* como el gen cuyas mutaciones causan ADLTE {Morante-Redolat, 2002 #7}.

En total se encontraron 8 cambios, 1 en *LGI2* (c.341 +18 T>C), otro en *LGI3* (c.422 +60 C>A) y 6 en *LGI4* (c.241 +47 A>G, c.456 C>T, c.834 G>C, c.960 C>T, c.1203 A>G y c.1395 GC>AT) representados en la **Figura 16**. Para la notación de los cambios hemos adoptado las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) que sugieren el uso del prefijo “c.” cuando la descripción del cambio se refiera a la secuencia del cDNA y del prefijo “p.” cuando el cambio se refiera a la secuencia de la proteína. Los cambios intrónicos han sido nombrados sumando la distancia en número de pares de bases a la base final del exón más cercano.

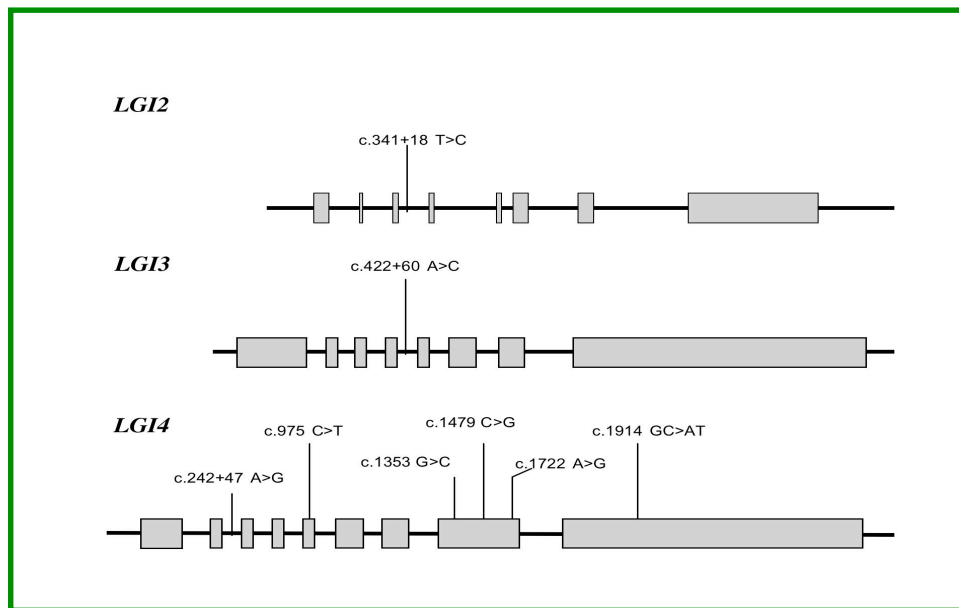


Figura 16. Representación genética de los cambios encontrados en *LGI2*, *LGI3* y *LGI4*. Los rectángulos grises corresponden a los exones de los genes, mientras que la raya negra corresponde a la región no codificante.

Resultados y Discusión

En la **figura 17** se muestran los electroferogramas de los cambios encontrados en cada uno de los genes estudiados.

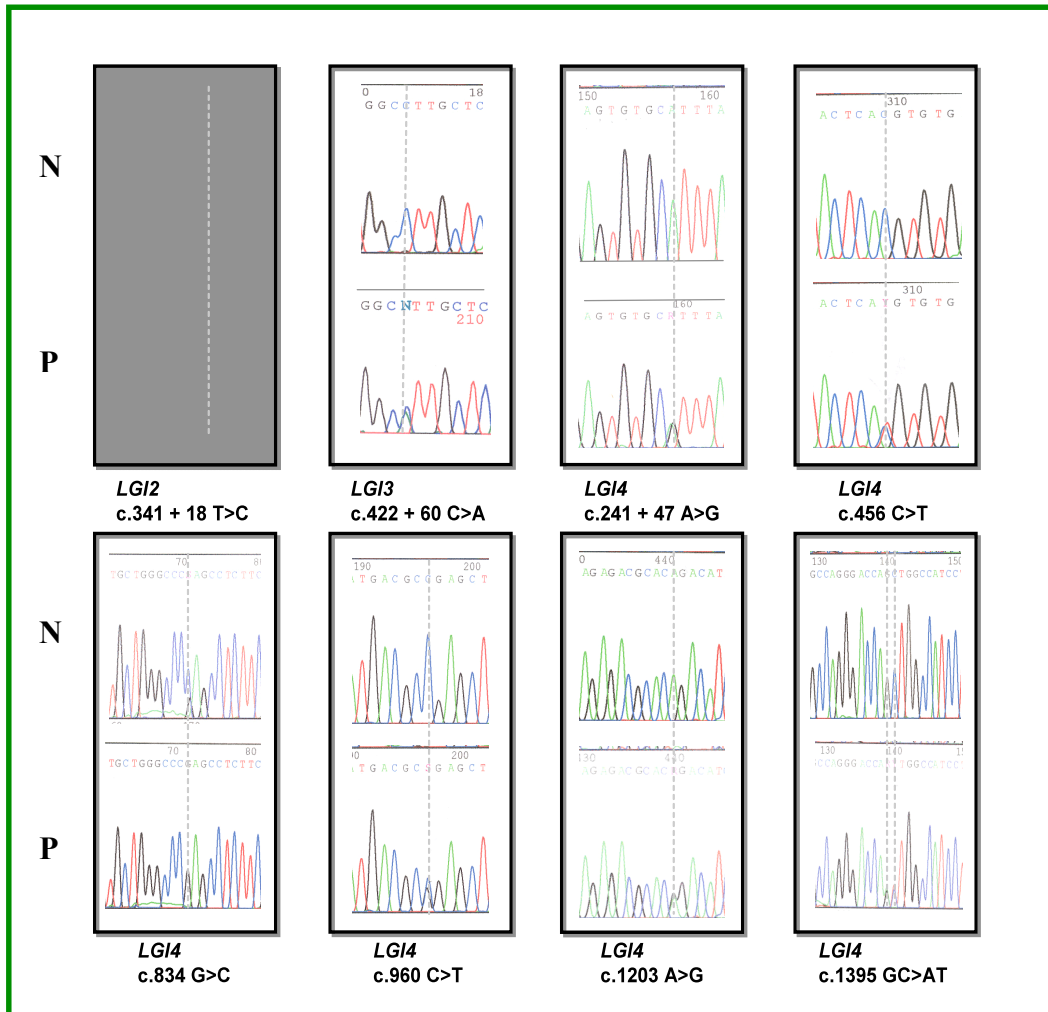


Figura 17. Electroferogramas mostrando la secuencia normal del gen (N) y la secuencia con los polimorfismos encontrados (P) para cada uno de ellos. Sólo se encontró un cambio en *LGI2* c.341 +18 T>C. En *LGI3* también se encontró sólo un cambio c.422 +60 C>A. En *LGI4* se encontraron 6 cambios; c.241 +47 A>G, c.456 C>T, c.834 G>C, c.960 C>T, c.1203 A>G y c.1395 GC>AT, que están ordenados en la figura de izquierda a derecha en orden ascendente con respecto a su posición en el cDNA del gen.

Una vez encontrados todos estos cambios, quisimos ordenarlos con respecto al origen étnico de las familias en las que estaban presentes. En la tabla 9 se representan los cambios encontrados y se detalla el origen de cada familia estudiada.

Tabla 9. Cambios encontrados en la muestras los casos *propositus* con ADLTE. ESP, ITA y DEU hacen referencia a la nacionalidad de las familias (Española, Italiana y Alemana), siendo el origen de las familias Españolas, Vasco en todas ellas. Se encontraron polimorfismos en todos los *casos propositus* menos en el correspondiente a la familia ITA2.

Familia	Origen	LG12	LG13	LG14					
		c.341+18 T>C	c.422+60 A>C	c.242+47 A>G	c.456 T>C	c.834 G>C	c.960 C>G	c.1203 A>G	c.1395 GC>AT
ESP1	Vasco	-	-	+	-	+	-	+	+
ESP2	Vasco	-	-	-	-	-	-	-	-
ESP3	Vasco	+	-	-	-	-	-	-	-
ESP4	Vasco	+	-	-	-	+	-	+	-
ESP5	Vasco	+	-	+	-	-	-	-	-
ESP6	Vasco	+	+	+	-	+	-	+	+
ESP7	Vasco	+	+	-	+	+	+	+	+
ITA1	Italiano	-	-	-	-	-	-	-	+
ITA2	Italiano	-	-	-	-	-	-	-	-
ITA3	Italiano	-	-	-	-	-	-	-	+
ITA4	Italiano	+	+	-	-	-	-	-	-
DEU1	Alemán	-	-	+	-	-	-	-	+

Debido al distinto origen étnico de las familias, cada cambio encontrado se comparó con una muestra control de origen vasco que constaba de 30 cromosomas y con una muestra control de origen no vasca que también constaba de 30 cromosomas. Debido a que no existe ninguna evidencia genética de que la población española sea genéticamente diferente a la alemana o italiana, se utilizó la muestra control no vasca como control de las familias italianas y alemana.

Resultados y Discusión

Las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas de cada cambio en las diferentes poblaciones control se recogen en la [tabla 10](#).

Tabla 10. Relación de frecuencias de los cambios encontrados en una muestra control de 30 cromosomas de origen vasco y de otra muestra control de 30 cromosomas de origen no vasco.

Polimorfismo	Población Control	Frecuencias genotípicas (n (%))			Frecuencias alélicas (%)	
		W/W	W/M	M/M	W	M
LGI2						
c.341 +18 T>C	Vasca	22 (73,3)	6 (20,0)	2 (6,6)	83,3	16,6
	No Vasca	22 (73,3)	8 (26,7)	0 (0,0)	86,6	13,3
LGI3						
c.422 + 60 A>C	Vasca	20 (66,6)	9 (30,0)	1 (3,3)	81,6	18,3
	No Vasca	18 (60,0)	10 (33,3)	2 (6,6)	76,8	23,2
LGI4						
c.242 +47 A>G	Vasca	10 (33,3)	11 (36,6)	9(30,0)	51,6	48,3
	No Vasca	11 (36,6)	13 (43,3)	6(20,0)	58,3	41,6
c.456 T>C	Vasca	27 (90,0)	3 (10,0)	0 (0,0)	95,0	5,0
	No Vasca	25 (83,3)	5 (16,6)	0 (0,0)	91,6	8,3
c.843 G>C	Vasca	16 (53,3)	12 (40,0)	2 (6,6)	73,3	26,6
	No Vasca	13 (43,3)	17 (56,6)	0 (0,0)	71,6	28,3

Resultados y Discusión

c.960 C>G	Vasca	28 (93,3)	2 (6,6)	0 (0,0)	96,6	3,3
	No Vasca	29 (96,6)	1 (3,3)	0 (0,0)	98,3	1,7
c.1203 A>G	Vasca	16 (53,3)	12 (40,0)	2 (6,6)	73,3	26,6
	No Vasca	13 (43,3)	17 (56,6)	0 (0,0)	71,6	28,3
c.1395 GC>AT	Vasca	17 (56,8)	11 (36,6)	2 (6,6)	75,1	24,9
	No Vasca	19 (63,4)	9 (30,0)	2 (6,6)	78,4	21,6

También se trabajó con una muestra de 38 pacientes de origen italiano afectados por la forma esporádica de este tipo de epilepsia (LTE). Con esta muestra se llevó a cabo una aproximación experimental diferente. Se caracterizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los mismos cambios encontrados en las formas familiares, y se compararon frente a una población control de 41 cromosomas con el mismo origen étnico, es decir, italiano (Tabla 11).

Tabla 11. Relación de frecuencias encontradas en los cambios descritos en las formas esporádicas, comparando la muestra esporádica con su correspondiente grupo control.

Polimorfismo	Población Control	Frecuencias genotípicas (n (%))			Frecuencias alélicas (%)	
		W/W	W/M	M/M	W	M
LGI2						
c.341 +18 T>C	LTE	27 (71,3)	8 (21,3)	3 (7,3)	81,9	18,1
	Control	28(68,3)	13 (31,7)	0 (0,0)	84,6	15,3
LGI3						
c.422 + 60 A>C	LTE	26(68,4)	10 (26,3)	2 (5,3)	81,1	18,9

Resultados y Discusión

	Control	25(60,8)	16 (39,2)	0 (0,0)	80,4	19,6
LGI4						
c.242 +47 A>G	LTE	14 (36,1)	14 (36,1)	10(26,8)	54,2	45,8
	Control	15 (36,8)	18 (43,9)	8 (19,3)	58,7	41,3
c.456 T>C	LTE	30(78,8)	6 (15,8)	2 (5,2)	86,7	13,3
	Control	33(80,5)	7 (17,0)	1 (2,5)	89,0	11,0
c.843 G>C	LTE	20(52,6)	16 (42,1)	2 (5,2)	73,7	26,3
	Control	23 (56,1)	18 (43,9)	0 (0,0)	78,0	22,0
c.960 C>G	LTE	37 (97,3)	1 (2,7)	0 (0,0)	98,6	1,3
	Control	38(92,7)	3 (7,3)	0 (0,0)	96,3	3,7
c.1203 A>G	LTE	22 (57,9)	15 (39,5)	1 (2,6)	77,6	22,3
	Control	22 (53,7)	19 (46,3)	0 (0,0)	76,8	23,2
c.1395 GC>AT	LTE	20(52,6)	13 (34,2)	5 (13,2)	69,7	30,3
	Control	16(39,0)	20(48,8)	5 (12,2)	63,4	36,6

4.3.1 Identificación de polimorfismos en LGI2 y estudio poblacional

El gen LGI2 está localizado en el cromosoma 4p15.2 y consta de 8 exones. Para genotipar cada exón del gen LGI2, se secuenció un *caso propositus* por familia diagnosticada con ADLTE. En 6 de las 12 familias se encontró el cambio c.341+18 T>C, localizado a 18 pares de bases del comienzo del intrón 3. Se trataba de un cambio sin identificar hasta la fecha, así que se mandó a la base de datos del NCBI para que lo incorporaran (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Para verificar si este cambio encontrado en la población ADLTE estaba relacionado con la aparición de la enfermedad, se analizó la segregación del polimorfismo en cada una de las familias. A su vez, se analizó la presencia de este cambio en la población control vasca y en la población control no vasca (tabla 10). Como el cambio de una A por una C, no introducía ninguna diana nueva de

restricción en la secuencia del gen ni tampoco la eliminaba, diseñamos un ensayo de amplificación refractaria (ARMS).

No se encontró ninguna segregación del cambio con la enfermedad, y además, el cambio estaba presente en la población control con una frecuencia alélica similar, independiente del origen étnico {Ayerdi-Izquierdo, 2006 #53}.

Para determinar si la presencia de este polimorfismo aumentaba el riesgo de probabilidad de sufrir epilepsia lateral temporal (LTE), utilizamos una estrategia caso control con la muestra de 38 pacientes con LTE. El cambio c.341 +18 T>C también se encontró en una frecuencia alélica similar tanto en los pacientes como en la población control de 82 cromosomas (tabla 11).

Utilizando el programa de predicción de cortes proteolíticos alternativos (NNSPLICE 0,9) se encontró que este cambio no generaba ninguna secuencia de corte alternativo (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

4.3.2 Identificación de polimorfismos en LGI3 y estudio poblacional

LGI3 es un gen que consta de 8 exones y está localizado en el cromosoma 8p21.3. Al genotipar este gen en 12 casos *propositus* (uno por cada familia), se encontró que el cambio a 60 pb del intrón 4, que denominamos c.422+60 A>C, estaba presente en 3 de las 12 familias. Este cambio generaba una nueva diana de restricción para el enzima *Bsr* *DI* (GCAATGNN[^], Fermentas), así que se amplificó el exón 4 de todas las muestras y se analizó mediante una digestión a 60°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa, cuyas bandas se identificaron gracias al marcador de peso molecular de 1kb.

Este cambio estaba presente con una frecuencia alélica similar tanto en la población control vasca como en la población control no vasca. También presentaba la misma frecuencia alélica en la muestra de pacientes con LTE y su correspondiente muestra control.

Resultados y Discusión

Este polimorfismo era un SNP sin identificar previamente a este estudio, de manera que se envió a la base de datos del NCBI para que se incluyera. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) {Ayerdi-Izquierdo, 2006 #58}.

Utilizando el programa de predicción de cortes proteolíticos alternativos (NNSPLICE 0,9) se determinó que este cambio no generaba ninguna secuencia de corte alternativo (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

4.3.3 Identificación de polimorfismos en LGI4 y estudio poblacional

El gen LGI4 consta de 9 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.12. Se secuenciaron cada uno de los 9 exones para cada caso *propositus*. El análisis de las secuencias reveló 6 cambios, siendo tan sólo uno de ellos intrónico (tabla) {Ayerdi-Izquierdo, 2006 #58}. Ninguno de los 6 cambios generó un sitio nuevo de procesamiento al hacer una predicción con el programa NNSPLICE 0,9.

4.2.3.1 c.242+47A>G

Este cambio se encontró en 4 de las 12 familias estudiadas. El polimorfismo se encontraba a 47 pb del final del exón 4 y no generaba ni alteraba ninguna diana de restricción en la secuencia del gen, así que se analizó mediante ARMS. La frecuencia alélica de este cambio en población control fue la similar independientemente del origen étnico de la misma. La frecuencia de aparición en pacientes con LTE y sus correspondientes controles tampoco presentaba diferencias significativas.

4.2.3.2 c.456C>T

El cambio c.456 C>T se encontró únicamente en un caso *propositus* de los 12 con los que comenzamos el estudio. El cambio eliminaba una diana de restricción para el enzima de *Eco* 072I (CAC[^]GTG, Fermentas), de manera que

una vez amplificado el exón 5 por PCR, se digirieron y analizaron las muestras mediante geles de agarosa al 2%. La frecuencia alélica de las poblaciones control comparadas con la población familiar afectada no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Este cambio también estaba presente en los pacientes con epilepsia lateral temporal esporádica y en sus correspondientes controles con una frecuencia estadística similar.

4.2.3.3 c.834 G>C

4 de los 12 casos *propositus* presentaron este cambio en sus secuencias. La aparición de una C, eliminaba una diana de restricción para el enzima *Eco O109I* (G[^]GNCC, Fermentas), así que se diseñó un ensayo RFLP para analizar la presencia de este cambio en población control.

Las frecuencias alélicas no revelaron diferencias para este cambio en ninguna de las poblaciones control estudiadas. Además, este cambio estaba presente en la población esporádica de epilepsia lateral temporal, así como en la población control correspondiente a 82 cromosomas con una frecuencia similar.

4.2.3.4 c.960C>G

Este cambio generaba una nueva diana de restricción para el enzima *BstU1* (CG[^]CG, Fermentas). Se trataba de un cambio sin identificar hasta la fecha y fue mandado a la base de datos de SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Este polimorfismo se encontró en 1 caso *propositus* de los 12, aunque su estudio en población control demostró que estaba presente en población con una frecuencia parecida.

Resultados y Discusión

Además, la población esporádica y sus correspondientes controles también fueron genotipados para este cambio, y se encontró en una frecuencia alélica similar a la presente en los casos familiares y la población control.

4.2.3.5 c.1203A>G

Este polimorfismo fue hallado en 3 casos *propositus* de los 12 casos *propositus* familiares. Ninguna diana de restricción se veía afectada o se generaba con este cambio, así que se estudió en población control mediante amplificación refractaria.

El genotipaje de este cambio en la población control de los casos familiares, así como en los casos esporádicos y sus correspondientes controles, revelaron una frecuencia de aparición que no era estadísticamente diferente entre las distintas poblaciones estudiadas.

4.2.3.6 c.1395 GC>AT

Este SNP estaba presente en 6 de los 12 casos *propositus* familiares. El cambio eliminaba una diana para el enzima *Alu I* (AG^{CT}, Fermentas), así que el resto de poblaciones se genotiparon mediante un ensayo RFLP, y las muestras digeridas se corrieron en geles de acrilamida. El genotipado reveló una frecuencia alélica que no era significativamente diferente a la frecuencia de este SNP en población control. Además, también estaba presente en las muestras con el tipo de epilepsia esporádica, así como en su población control correspondiente.

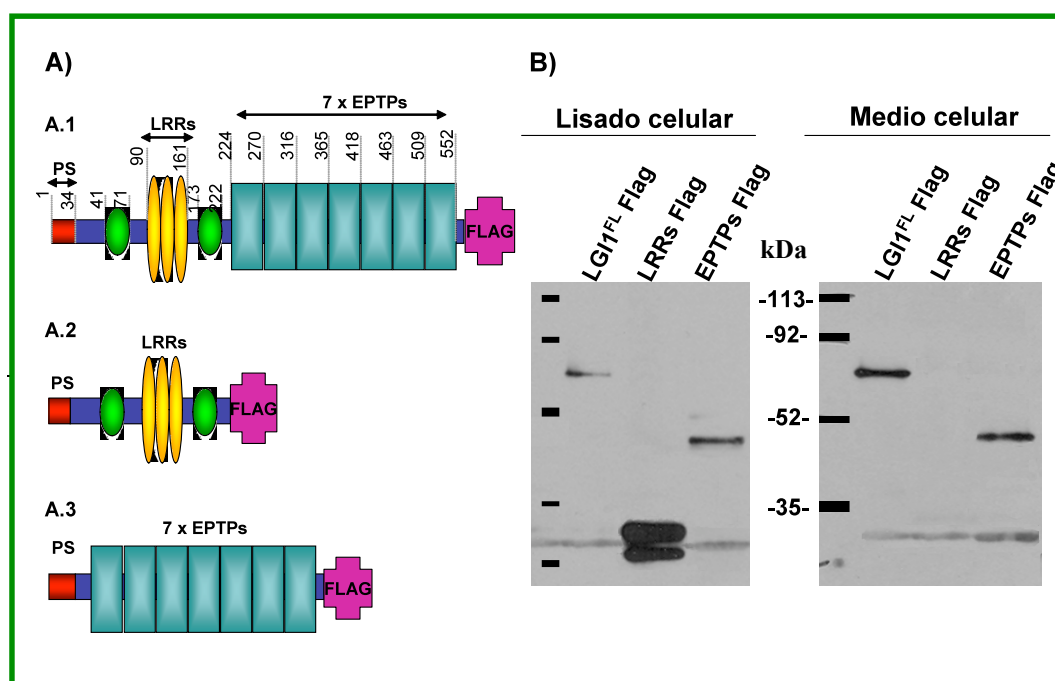
Con estos resultados, no parece que ninguno de los cambios encontrados en los 3 parálogos, por si solos, estén implicados en la aparición de ADLTE. Dado que, en el momento que se empezó esta tesis, apenas se sabía algo sobre la

función de LGI1, y la función del resto de parálogos era totalmente desconocida, decidimos centrarnos en la caracterización de la función de LGI1.

4.4 Análisis de dominios de LGI1

LGI1 presenta dos dominios bien diferenciados en su arquitectura genómica. En N terminal presenta un dominio rico en leucinas (LRR) flanqueado por un dominio rico en cisteínas, mientras que en C terminal presenta el dominio EPTP, dominio compuesto por la repetición 7 veces en tándem de una secuencia. Como hemos comentado en el apartado 4.2, LGI1 es una proteína que se secreta, así que decidimos determinar el impacto de cada uno de estos dos dominios en la secreción de LGI1. Para eso, se clonó el péptido señal de LGI1 seguido de las LRRs flanqueadas por los dominios ricos en Cisteína en el vector pFlag (vector que incorpora en pauta la etiqueta Flag en C terminal) y por otra parte, se clonó el péptido señal de LGI1 seguido de las EPTPs en el vector pFlag (Figura 18 A).

Estas construcciones se transfectaron transitoriamente en células HEK 293T, y 48 horas después de la transfección se procesaron los lisados celulares y los medios. En La figura 18 B se muestra como la construcción con el péptido señal y las LRRs (plásmido A.2: p LRRs Flag) queda retenida en la célula, mientras que la construcción con péptido señal y las EPTPs es secretada al medio (plásmido A.3: p EPTPs Flag).



Resultados y Discusión

Figura 18. Estudio de la implicación de los dominios de LGI1 en su secreción. Se transfectaron las células HEK 293T con las construcciones pLGI1^{FL}-Flag (A.1), pLRRs-Flag (A.2) y pEPTPs-Flag (A.3). La forma completa de LGI1 (64 kDa) y el dominio EPTPs (45 kDa) se secretan al medio celular (panel derecha B), mientras que el dominio LRR (27 kDa) se queda retenido en el lisado celular. El *Western blot* se reveló utilizando el anticuerpo monoclonal anti Flag M2 (Sigma).

Teniendo en cuenta este resultado, decidimos determinar el mínimo número de dominios tipo EPTP que se necesitan para que la proteína LGI1 se secrete. Para eso, se intentó “rescatar” la secreción de la construcción pLRRs Flag (que no tiene EPTPs) añadiendo una a una cada EPTP. La **figura 19** demuestra que sólo la proteína completa, es decir, con las 7 EPTPs es secretada.

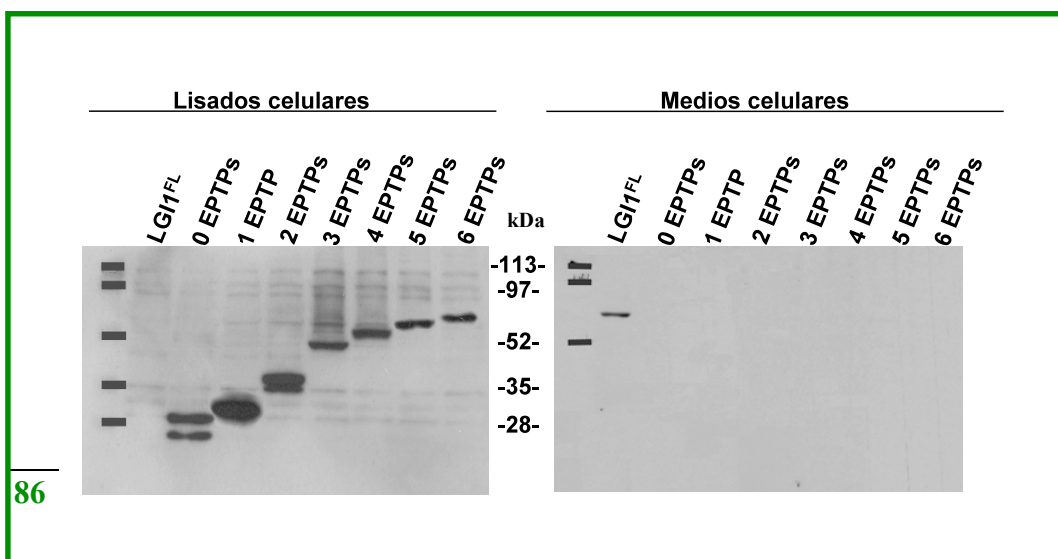


Figura 19. Número mínimo de repeticiones tipo EPTP que necesita LGI1 para ser secretada. Se transfectaron células HEK 293T con construcciones que aumentaban una a una el número de repeticiones tipo EPTP en la construcción p LRRs-Flag, que tiene cero EPTPs. Sólo la forma completa de LGI1, es decir, con las 7 EPTPs se secreta al medio celular. El *Western blot* se reveló utilizando el anticuerpo monoclonal anti Flag M2 (Sigma).

4.5. LGI1 como ligando extracelular

4.5.1 Ensayos de unión de AP-LGI1 soluble a la membrana

LGI1 es una proteína que se secreta así que es lógico pensar que podría ejecutar su función uniéndose a algún receptor de la superficie celular. Para poder determinar si esta hipótesis era válida, se llevó a cabo la estrategia de proteínas de fusión a la etiqueta fosfatasa alcalina (AP).

Esta metodología descrita por Flanagan y colaboradores permite detectar la capacidad de unión a membrana de un determinado ligando que se fusiona a fosfatasa alcalina {Flanagan, 2000 #63; Flanagan, 2000 #64}. La etiqueta AP (fosfatasa alcalina) tiene una actividad enzimática intrínseca que se puede detectar fácilmente con diferentes sustratos cromogénicos. La isozima AP humana de la placenta es muy estable, así que LGI1 se clonó en el vector pc

Resultados y Discusión

DNA3.1 AP 6 (cedido por la Dra. Alysso Fournier, *MNI, McGill, Canadá*) en posición C Terminal con respecto a la etiqueta AP.

El objetivo de este experimento era demostrar que añadiendo LGI1 exógenamente a células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal, ésta era capaz de unirse de manera específica a la membrana de estas células.

El tratamiento se llevó a cabo utilizando medios condicionados enriquecidos en la proteína de fusión AP-LGI1 o bien medio enriquecido en la proteína AP, que se utilizó como medio control. Estos medios condicionados se obtuvieron transfectando primero células HEK 293T con los plásmidos AP-LGI1 y AP (plásmido control), y 72 horas después de la transfección, se recogieron y se concentraron. La concentración de AP-LGI1 y AP se estimó mediante la medida enzimática de la fosfatasa alcalina en el medio mediante el sustrato cromogénico p-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma), que se convierte en un producto amarillo cuya absorbancia puede medirse a 405 nm.

Inicialmente se realizó la detección de la unión de AP-LGI1 *in situ* sobre células PC12 diferenciadas con NGF en cultivo. Las células se trataron con medios condicionados que contenían AP-LGI1 o AP a una concentración de 15 nM y, tras los correspondientes lavados, se detectó la presencia de proteína mediante el sustrato cromogénico de la AP NBT/BCIP, que tiñe de color oscuro las zonas en las que existe actividad AP y por tanto, y en nuestro caso, las zonas en las LGI1 estaría presente.

En la **figura 20** se observa una fuerte unión de AP-LGI1 a las PC12 diferenciadas, marcándose tanto el soma como las neuritas. No se observa unión, sin embargo, en las células tratadas con medio control (AP), de manera que la unión que observamos con AP-LGI1 sería una unión específica.

JORDI NO PONGO la figura porque ocupa mogollón, te la cuelgo a parte.

Figura 20. Unión de AP-LGI1 a la superficie de células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal. Células PC12 diferenciadas con 50 ng/ml de NGF durante 48 horas, y tratadas después con medio condicionado concentrado conteniendo AP-LGI1 (B,C y D) o control AP a 15 nM. La actividad fosfatasa alcalina se reveló mediante los sustratos cromogénicos NBT/BCIP. A y B están fotografiadas con un aumento 10X, C a 20X y D a 40X.

4.5.2 AP-LGI1 uniéndose a la superficie de forma dosis dependiente

El uso de proteínas de fusión a AP permite, además de la detección *in situ*, la cuantificación de la unión mediante la incubación del lisado total de las células preincubadas con la proteína de fusión con el sustrato específico de la AP, pNPP, que produce un producto amarillo que se puede medir en un espectrofotómetro a 405 nm.

Para establecer si la unión de AP-LGI1 a las células PC12 diferenciadas resultaba dependiente de dosis, sugiriendo por tanto la presencia de un sitio de unión específico en la membrana, se incubaron las células con concentraciones creciente de AP-LGI1 o AP (0 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM y 40 nM) lavando posteriormente el exceso de proteína no unida a la membrana. La detección se realizó sobre el lisado celular en condiciones no limitantes de sustrato de la fosfatasa alcalina (pNPP) deteniendo la reacción a los 120 min, tiempo para el

Resultados y Discusión

que previamente se había comprobado que la reacción con la máxima concentración de AP-LGI1 no alcanzaba un punto de saturación por consumo del sustrato. Para normalizar los datos se midió la concentración de proteína total en cada lisado expresándose los resultados finales como el cociente entre la absorbancia a 405 nm proveniente del sustrato cromogénico de la AP y los mg de proteína ensayados multiplicados por 1000.

En la **figura 21** se observa como la unión de AP-LGI1 a la superficie de las células PC12 diferenciadas es dependiente de dosis, alcanzándose un punto de saturación lo que sugiere que existe un receptor específico de LGI1 en la superficie celular.

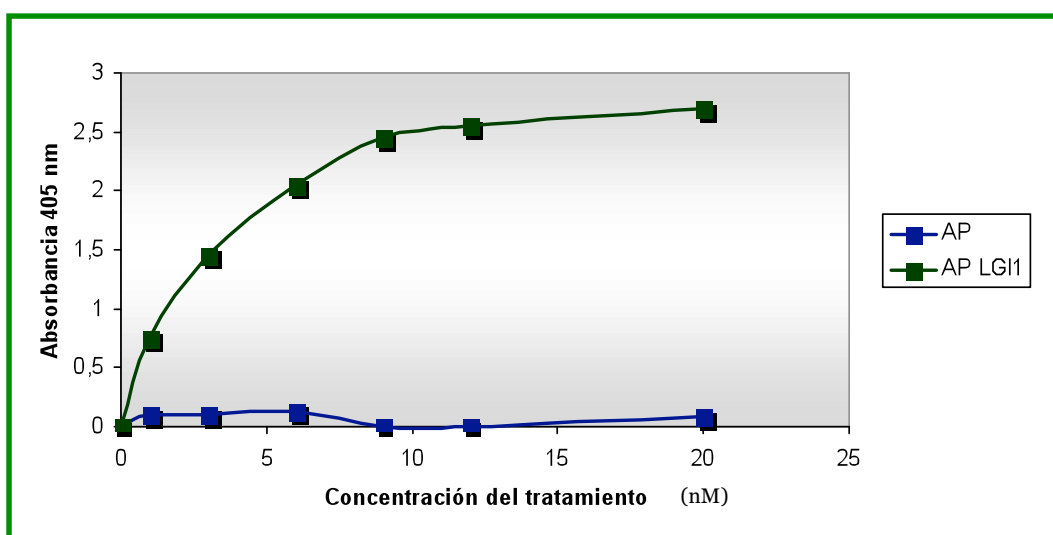


Figura 21. Curva de unión dependiente de dosis de AP-LGI1 a la superficie de las células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal. AP binding con concentraciones creciente de AP/AP-LGI1 sobre PC12 diferenciadas. Se representa concentración de medio condicionado frente a Absorbancia a 405 nm proveniente del sustrato pNPP normalizada entre condiciones dividiendo por los mg totales de proteína en el ensayo x 1000.

4.5.3 Efecto de LGI1 sobre el estado de fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares ERK1/2.

Hasta este apartado hemos demostrado que una vez LGI1 es secretada, se une de forma dependiente a la superficie celular de las células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal. Sin embargo, en este momento de la tesis, no se conocía receptor alguno al que pudiera unirse LGI1.

No obstante, sí que existían evidencias de que la reintroducción forzada de LGI1 en células de glioblastoma (sin expresión endógena de LGI1) promovía una reducción en los niveles de expresión de las metaloproteasas de matriz extracelular MMP1 y MMP3 y que este efecto era debido a la reducción en los niveles de ERK 1/2 fosforilado (Kunapuli *et al.*, 2004).

Quisimos, por ello, comprobar si la unión de LGI1 a la superficie de las células PC12 diferenciadas reproducía esta reducción en los niveles de ERK 1/2. Para evaluar el efecto de LGI1 sobre los niveles intracelulares de ERK 1/2 fosforilado, se utilizó la misma aproximación experimental que la que se había utilizado para determinar la unión de LGI1 a la membrana, es decir, cultivos de células PC12 diferenciadas durante 48 horas a fenotipo neuronal con NGF tratadas posteriormente con medios condicionados enriquecidos en AP y AP-LGI1.

La ruta de las MAP quinasas en la que se encuentra ERK 1/2, es una ruta de señalización muy sensible a señales extracelulares y se encuentra implicada en

Resultados y Discusión

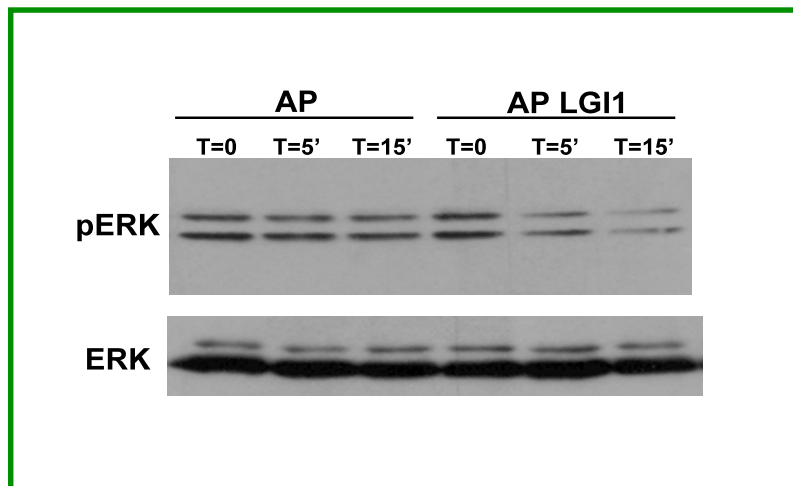
numerosos procesos celulares tan importantes como la proliferación y la diferenciación. De hecho, la diferenciación a fenotipo neuronal de las células PC12 mediada por el factor de crecimiento nervioso (NGF) implica niveles elevados y mantenidos de ERK 1/2 fosforilado. Por otra parte, durante el condicionamiento de los medios, las células HEK 293T transfectadas, además de secretar las proteínas de interés, secretan otro tipo de factores provenientes de su metabolismo que podrían afectar al estado activo de la ruta ERK 1/2. Para silenciar los posibles efectos sobre la ruta provenientes tanto de la incubación de las PC12 con NGF, como los provenientes de las moléculas presentes en el medio condicionado, una vez las PC12 estuvieron diferenciadas en NGF durante 48 horas y antes de llevar a cabo la incubación con los medios AP y AP-LGI1, hicimos lo siguiente: se aspiró el medio de las células PC12 diferenciadas y éstas se trataron durante 2 horas con medio condicionado concentrado proveniente de cultivos de células HEK 293T transfectadas sin ADN. Así durante esa incubación, habría tiempo para restablecer los niveles, que llamaríamos basales, de ERK 1/2 en nuestro sistema.

Una vez pasadas las 2 horas de incubación de las PC12 diferenciadas con el medio condicionado proveniente de células HEK 293T transfectadas sin ADN, se añadieron sobre las células los medios condicionados AP y AP-LGI1. Ambos medios se añadieron a una concentración de 15 nM, ya que a esta concentración y tal y como se observa en la figura 21, la unión a la membrana celular empieza a saturarse. La incubación de las PC12 diferenciadas con los medios se llevó a cabo en dos tiempos; de 5 minutos y de 15 minutos. Se esperaba que, en caso de existir algún efecto sobre el estado de fosforilación de ERK 1/2, fuera debido exclusivamente a la presencia de AP-LGI1.

En la **figura 22** se muestran los resultados del Western blot realizado con los lisados celulares de las células tratadas exclusivamente con medio condicionado control o medio condicionado control más medios enriquecidos en

AP o AP-LGI1. Como se puede observar, cuando incubamos las células PC12 diferenciadas con medio enriquecido AP, los niveles de ERK 1/2 fosforilados permanecen similares al estado basal ($t = 0$) en ambos tiempos (AP; $t = 5$ min y $t = 15$ min). Se puede observar también que existe una disminución en los niveles de ERK 1/2 fosforilado como consecuencia del tratamiento con medio AP-LGI1 en ambas medidas (AP-LGI1; $t = 5$ min y $t = 15$ min).

En el panel superior de la figura 22, se muestran los niveles totales de ERK 1/2 comprobándose que las diferencias son efectivamente en los niveles de la proteína en estado fosforilado.



Resultados y Discusión

Figura 22. Efecto de LGI1 soluble sobre el estado de fosforilación de ERK1/2. Células PC12 diferenciadas con NGF durante 48 horas se preincubaron durante 2 horas con medio condicionado proveniente de células HEK 293T para lograr un estado que se consideró basal. Tras ese tiempo se realizaron tratamientos con medio condicionado AP-LGI1 o medio control AP a una concentración de 15 nM durante 5 y 15 min. Los lisados se analizaron por *Western blot*, que se revelaron con anticuerpo anti fosfoERK (E4, Santa Cruz) en el caso del panel de arriba y anti ERK2(C14, Santa Cruz) en el panel de abajo.

Mediante el programa *Multigauge V2.1* de Fujifilm, se determinó el porcentaje de disminución en los niveles de fosfo-ERK1/2 calculando la relación entre la intensidad de las bandas de fosfo-ERK (pERK1+ pERK2) y la intensidad de las bandas de ERK totales (ERK1 + ERK2) para cada muestra. Los resultados se representaron como % de la relación pERK1/2 / ERK1/2 observada al inicio del tratamiento (t = 0) (Figura 23).

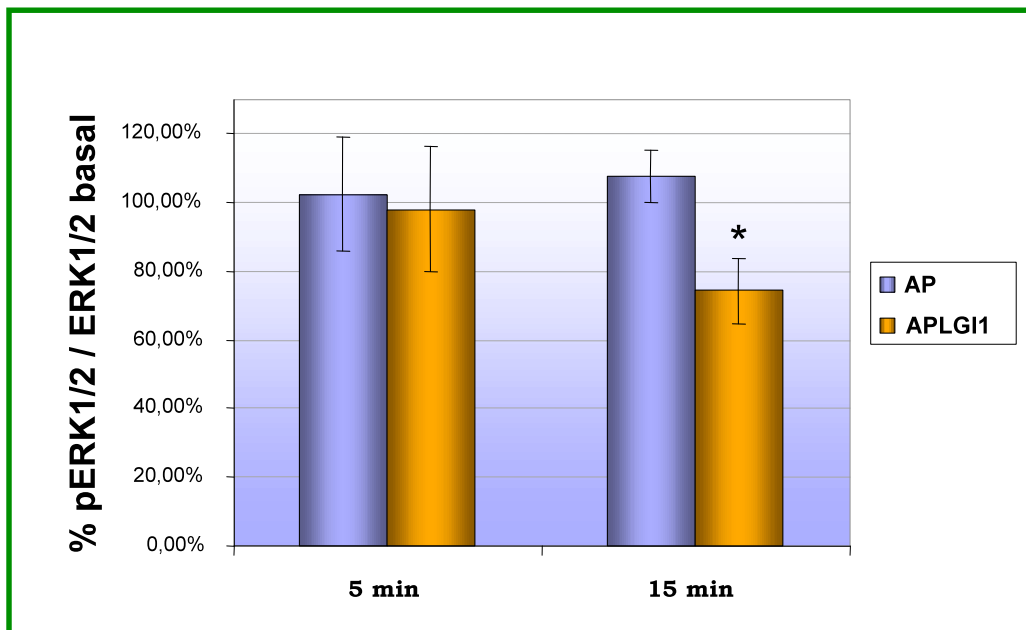


Figura 23. Relación pERK1/2 / ERK1/2 como porcentaje del estado basal (t=0). Se representa la relación entre la intensidad de las bandas de pERK1/2 respecto a las de ERK 1/2 total calculado como porcentaje respecto al estado basal a t=0. (*) p=0,02 t-Student. La cuantificación se llevó a cabo en tiempo 15 minutos y en tiempo 5 minutos.

4.5.4 Estudio de patrones de expresión de proteínas mediante chip de proteínas

Hasta aquí hemos visto que la unión de LGI1 a la membrana es capaz de promover la disminución en los niveles de fosforilación de ERK1/2. ERK1/2 es una quinasa clave en numerosas rutas de señalización intracelular reguladas por señales extracelulares, lo que sugiere que la unión de LGI1 a su supuesto receptor dispara alguna ruta de señalización intracelular que implica la reducción en los niveles de ERK1/2. Para intentar determinar si LGI1 ejerce su función regulando rutas de señalización específicas, se empleó la tecnología de microarrays de proteínas. Se analizaron los perfiles de expresión de proteínas en células PC12 diferenciadas durante 48 horas con NGF, a las que se les añadió medio condicionado AP /como medio control) y medio condicionado AP-LGI1 durante 15 minutos. Este es el tiempo en el que en el experimento anterior observábamos una reducción en los niveles de fosforilación de ERK1/2, de forma que podríamos detectar tanto proteínas reguladas directamente por LGI1 como proteínas reguladas por la vía de señalización de ERK 1/2. Para definir estos cambios en la expresión se empleó el chip CSAA1 de Sigma, que permite analizar la expresión de más de 200 proteínas cuyas funciones oscilan desde estar implicado en stress celular, a regular el ciclo celular o la apoptosis (Figura 24)

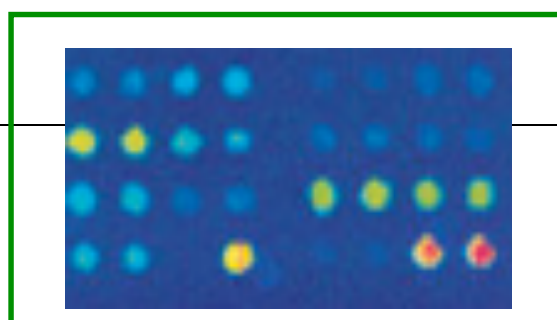


Figura 24. Imagen escaneada de un microarray hibridado. La presencia de mayor intensidad de color corresponde con una mayor intensidad de hibridación.

Para cada condición experimental, células control y células tratadas con LGI1, se llevaron a cabo dos réplicas (C-1, C-2, LGI1-1, LGI1-2). Se realizaron comparaciones 1 a 1 entre los 4 grupos experimentales (C-1/LGI1-1, C-1/LGI1-2, C-2/LGI1-1, C-2/LGI1-2) y únicamente aquellas proteínas cuyos niveles de proteína aumentaron o disminuyeron de la misma forma, en 3 de los 4 comparaciones se consideraron como proteínas con una expresión diferencial.

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el programa MultiGauge V2.1 de Fujifilm, con el cual se cuantifica el nivel de expresión de cada punto con respecto al punto control. Los valores netos de expresión fueron transformados a \log_2 como índice de cambio en la expresión (\log_2 Ratio). Para considerar que una proteína presentaba diferencias de expresión entre control y tratadas con LGI1, se consideró cambio de expresión cuando los ratios de las intensidades eran superiores a 0,75 (\log_2 Ratio $\geq 0,75$) o inferiores a -0,75 (\log_2 Ratio $\leq -0,75$). Es decir, como se trabajaba en logaritmo en base 2, se seleccionaron aquellas proteínas cuyos niveles de expresión fue al menos 1,68 veces superior (proteínas reguladas positivamente) o 1,68 veces inferior (proteínas reguladas negativamente), respecto al control.

Se encontraron un total de 14 proteínas reguladas, de ellas 11 reguladas positivamente, es decir, el tratamiento con LGI1 aumentaba su expresión con respecto al control y 3 reguladas negativamente, es decir, el tratamiento con LGI1 disminuía su expresión con respecto al control.

Las siguientes tablas muestran los resultados del análisis de microarrays de proteína. La **tabla 12** muestra las proteínas reguladas negativamente por LGI1 y la **tabla 13** las proteínas reguladas positivamente por LGI1.

Tabla 12. Proteínas reguladas negativamente por LGI1.

ID Sigma	L1 vs C1 (Ratio)	L1 vs C2 (Ratio)	L2 vs C1 (Ratio)	L2 vs C2 (Ratio)	Media	S.D.
Cdc27	-1,203	-2,075	-1,157	-1,994	-1,607	0,495
*Calponin	-9,085	-5,387	-1,900	-1,127	-4,374	3,646
e-NOS	-3,076	-1,590	-1,64	-1,95	-2,081	0,675

En la tabla se indica de izquierda a derecha: nombre de identificación de Sigma (ID Sigma), control 1 (C1), control 2 (C2), LGI1 1 (L1) y LGI1 2 (L2). Las últimas columnas muestran la media y la desviación estándar (S.D.) * Aún con una SD tan elevada, cumplía los requisitos de nuestra inclusión en la tabla.

Tabla 13. Proteínas reguladas positivamente por LGI1.

ID Sigma	L1 vs C1 (Ratio)	L1 vs C2 (Ratio)	L2 vs C1 (Ratio)	L2 vs C2 (Ratio)	Media	S.D.
Cdk6	0,774	1,567	0,479	0,970	0,948	0,460
*Need8	2,763	2,830	7,817	8,007	5,354	2,955
NGFR	0,718	1,249	0,462	0,803	0,808	0,328
TH	0,787	1,170	0,688	1,023	0,917	0,220
NAK	0,846	1,160	0,627	0,859	0,873	0,219
NFkB	0,707	1,180	0,499	0,833	0,805	0,286
JNK	0,790	1,057	0,624	0,835	0,827	0,179
p38 MAPK activated	0,906	1,627	0,560	1,006	1,025	0,444
MAPK (ERK1+ERK2)	0,782	1,039	0,634	0,843	0,825	0,168
PKC alpha	0,811	1,134	0,569	0,795	0,827	0,233
Pyk2	0,780	0,895	0,705	0,808	0,797	0,079

En la tabla se indica de izquierda a derecha: nombre de identificación de Sigma (ID Sigma), control 1 (C1), control 2 (C2), LGI1 1 (L1) y LGI1 2 (L2). Las últimas columnas muestran la media y la desviación estándar (S.D.) * Aún con una SD tan elevada, cumplía los requisitos de nuestra inclusión en la tabla.

Resultados y Discusión

La consulta de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) sirvió como apoyo para la clasificación de estos genes según las funciones biológicas que desempeñan. Los resultados de este análisis se muestran en la **figura 25**.

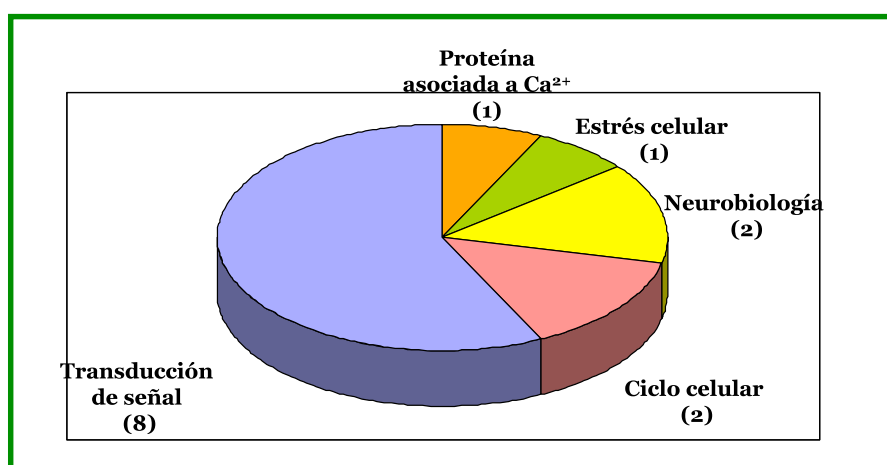


Figura 25. Representación funcional de proteínas activadas diferencialmente en células PC12 diferenciadas tratadas con LGI1 durante 15 minutos.

En las siguientes tablas se muestran diversas tablas de resultados del análisis en las que se han clasificado, según su función biológica, las proteínas reguladas positivamente (en rojo) y las proteínas reguladas negativamente (en azul).

Tabla 14. Clasificación funcional de las proteínas expresadas diferencialmente por LGI1 en células PC12 obtenidas utilizando el chip CSAA1 de Sigma. En la tabla se indica el nombre del anticuerpo (ID Sigma), el nombre de la proteína que reconoce el anticuerpo, así como las observaciones pertinentes para cada uno.

ID	Nombre	Observaciones
----	--------	---------------

Resultados y Discusión

Sigma		
Cdc27	Cell division cycle 27	Participa en los procesos iniciales de la replicación
Calponin	Calponin	Proteína asociada al citoesqueleto
e-NOS	Endothelial Nitric oxide synthase	Enzima de localización endotelial que participa en procesos de motilidad celular

ID Sigma	Nombre	Observaciones
Cdk6	Cyclin dependet kinase 6	Proteína reguladora del ciclo celular
NGFR	Nerve growth factor receptor	Receptor que puede unir NGF, BDNF, NT-3 y NT-4
TH	Tyrosin Hydroxylase	Desempeña un papel en la fisiología de neuronas dopaminérgicas
NAK	Tank binding kinase	Participa en la activación de NF κ B
NFκB	Nuclear Factor κ beta	Proteína reguladora de la transcripción
JNK	c-Jun-N-Terminal kinase	Participa en una gran variedad de procesos celulares

ID Sigma	Nombre	Observaciones
p38 MAPK activated	Mitogen activated protein p38	Proteína implicada en múltiples procesos de señalización intracelular
MAP Kinase (ERK1+ERK2)	Mitogen activated protein kinase	Participa en procesos de señalización intracelular
PKC α	Protein Kinase C α	Implicada en diversas rutas de señalización intracelular
Pyk2	Proline rich tyrosine kinase 2	Participa en la activación de la ruta de las MAP kinasas

■ Proteínas reguladas negativamente

Resultados y Discusión

■ Proteínas reguladas positivamente

Cuando LGI1 se une a membrana de células PC12 diferenciadas, los resultados muestran mayoritariamente una regulación positiva en proteínas implicadas en la transducción de señal a nivel intracelular. Este resultado, en general, corrobora la hipótesis de que LGI1 podría desempeñar su función como ligando extracelular y, una vez unida a su posible receptor en la superficie de las células PC12, sería capaz de activar cascadas de señalización intracelular.

Sin embargo, todas estas proteínas activadas diferencialmente participan en una gran variedad de procesos que comprenden desde la proliferación celular, diferenciación celular, desarrollo, y/o regulación de la transcripción. Varias de estas funciones ya se habían intentado atribuir a LGI1 por varios grupos. No obstante, los resultados en los que se apoyaban no eran lo suficientemente contundentes como para poder explicar las hipótesis planteadas por otros grupos. Después de una extensa búsqueda bibliográfica, ninguna de las rutas que se activaban nos dió una idea clara de la función de LGI1 y cómo sus mutaciones podrían causar epilepsia.

En este momento, se publicaron 2 artículos que nos ayudaron a orientarnos: “The claw paw mutation reveals a role for LGI4 in peripheral nerve development” {Bermingham, 2006 #46} y “The epilepsy linked protein LGI1 assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta 1” {Schulte, 2006 #32}

El artículo de Bermingham y colaboradores proponía una función para LGI4 en el desarrollo del sistema nervioso central. El artículo de Schulte y colaboradores proponía a LGI1 como proteína integrante del canal Kv1.1. Decidimos entonces, intentar caracterizar la función de LGI1 como proteína asociada al canal y como proteína precursora de mielina en el SNC.

4.6 Caracterización funcional de LGI1

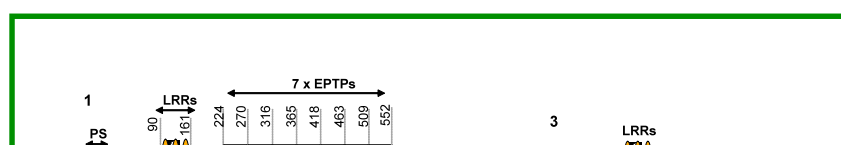
4.6.1 LGI1 como integrante del canal Kv1.1

Schulte y colaboradores encontraron que LGI1 se encuentra asociado a la subunidad Kv1.1 de los canales iónicos presinápticos dependientes de voltaje tipo A que modulan la transmisión sináptica en las neuronas del SNC {Schulte, 2006 #32}. En estos canales, la inactivación está mediada por la subunidad Beta (Kv β 1), que se encargaría de actuar como una bola cerrando el poro, y evitando así, el intercambio de iones.

Para explicar la capacidad de LGI1 para acomplejarse y modular la cinética de inactivación de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo A, los autores propusieron un modelo en el que, en el hipocampo, cada subunidad Kv1.1 se uniría a una subunidad Kv β 1 y una subunidad de LGI1, estando esta unión directamente implicada en las propiedades eléctricas de las neuronas. Este modelo, y a pesar de que LGI1 no presenta una estructura típica de subunidad de canal iónico, establecería un posible mecanismo que explicaría la aparición de crisis epilépticas por mutaciones en LGI1.

Nuestros resultados corroboran la hipótesis de que cuando LGI1 se secreta y se une a la superficie de células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal, existe una activación en varias cascadas de señalización intracelular. Por tanto, no conseguíamos encajar la idea de que desempeñara su función uniéndose al canal de manera intracelular. Schulte y colaboradores encontraron a LGI1 en un pull down de cerebro de rata con Kv1.1, pero no habían hecho estudios moleculares para definir la interacción física de LGI1 con los integrantes del canal.

Quisimos delinear, por tanto, la unión de LGI1 con la subunidad Kv β 1 y Kv1.1 mediante la técnica de coimmunoprecipitación. Para ello se clonaron tanto

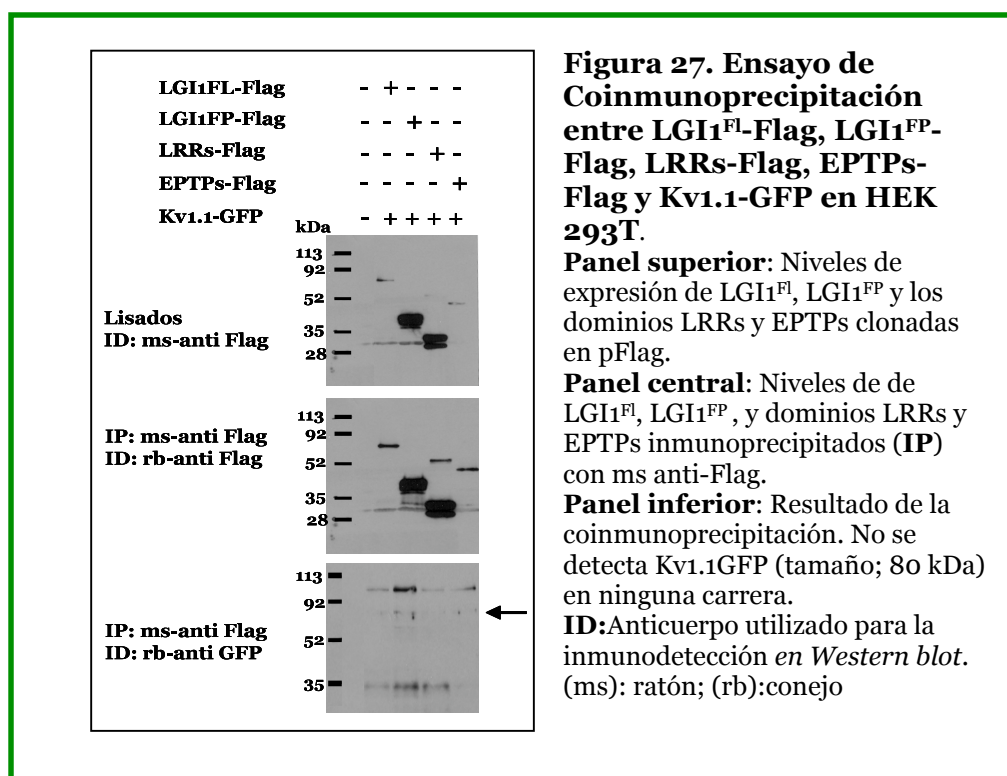


Resultados y Discusión

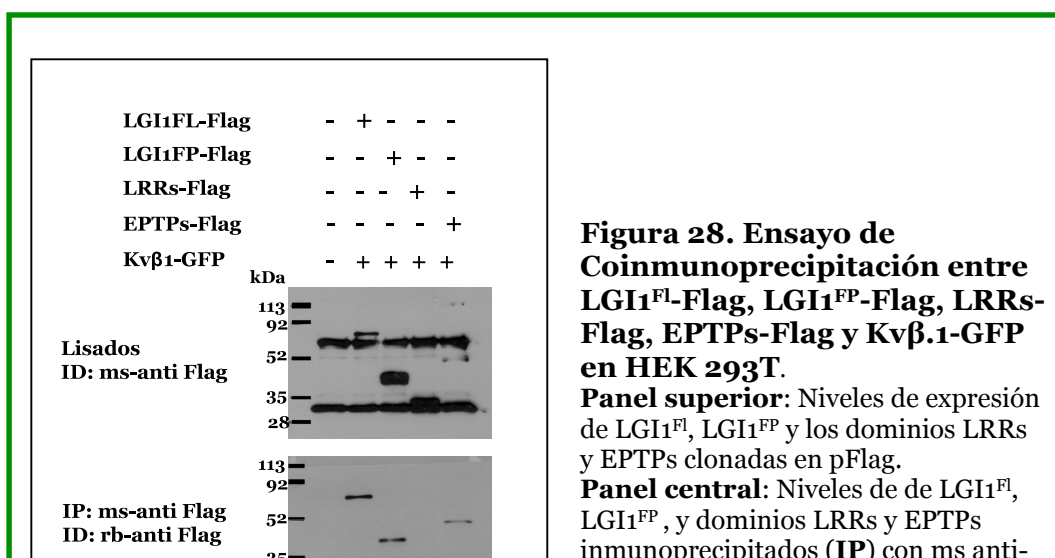
Kv1.1 como Kv α 1 en el vector pEGFP que fusiona la etiqueta GFP en pauta en C terminal y se co-transfectaron las células HEK 293T transitoriamente (mediante el método de fosfato cálcico) con la forma silvestre de LGI1 (pLGI1^{FL}-Flag), la forma procesada de LGI1 (pLGI1^{FP}-Flag), el dominio LRR de LGI1 (pLRRs-Flag) y el dominio EPTP de la proteína (pEPTPs-Flag) (Figura 26).

Figura 26. Contrucciones de LGI1 empleadas para los ensayos de Coimmunoprecipitación con Kv1.1 y Kv β 1.
1:pLGI1FL-Flag; 2:pLGI1FP-Flag; 3: pLRRs-Flag; 4: pEPTPs-Flag

Con este experimento quisimos averiguar con qué dominio de LGI1 interaccionaría Kv α 1 (en caso de interaccionar) y si la forma procesada de LGI1 (que no se secreta) sería la responsable del efecto funcional en la propiedades eléctricas del canal visto por el grupo de Schulte y colaboradores. La figura 27 muestra como ninguna de las formas de la proteína LGI1 coimmunoprecipita con pKv1.1-GFP. Este resultado era esperado ya que, aunque Schulte y colaboradores habían encontrado LGI1 en el pull down con Kv1.1, los efectos funcionales que encontraron en la cinética de inactivación de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo A , los atribuyeron a la interacción de LGI1 con la subunidad Kv α 1 del canal.



Se llevó a cabo el mismo experimento de cotransfección, esta vez con la construcción pKv β 1-GFP. La **figura 28** muestra como tampoco ninguna de las formas ni dominios de LGI1 interacciona mediante esta técnica con la subunidad del canal. Proponemos por tanto, que en caso que LGI1 llevara a cabo su función intracelularmente y como integrante del canal Kv1.1, lo haría uniéndose a otra proteína (por determinar) que a su vez se uniera a la subunidad Kv β 1.



4.6.2 LGI1 como factor de supervivencia de las células precursoras de oligodendrocitos (OLN93)

Analizando el ratón con hipomielinización “claw paw”, Bermingham y colaboradores encontraron que ese defecto estaba causado por una inserción en el gen LGI4 que impedía que llevara a cabo su función correctamente. Proponen con sus resultados, que LGI4 controle la formación de mielina en el sistema nervioso periférico.

LGI1 se expresa fundamentalmente en el SNC. En este sistema, el proceso de mielinización está coordinado por los oligodendrocitos y sus interacciones con los axones. Quisimos averiguar entonces, si LGI1 tendría algún efecto en el

proceso de formación de mielina mediante los oligodendrocitos. Se trabajó con células OLN93, células precursoras de oligodendrocitos.

Primero se determinó si LGI1 se expresaba en estas células. La RT-PCR de la **figura 29** muestra que LGI1 no se expresa en estas células.

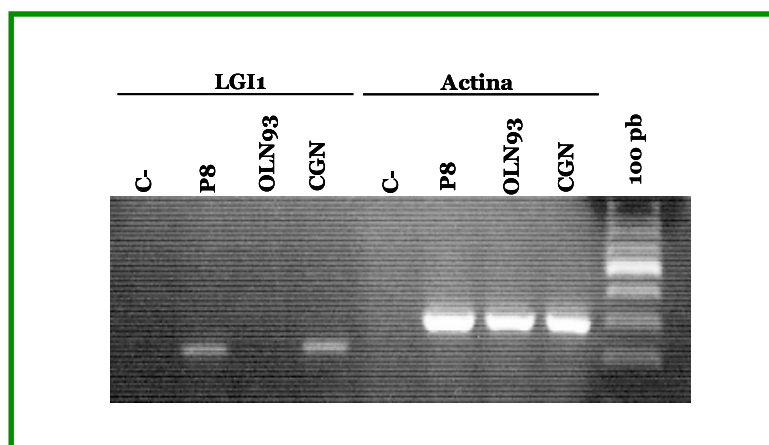
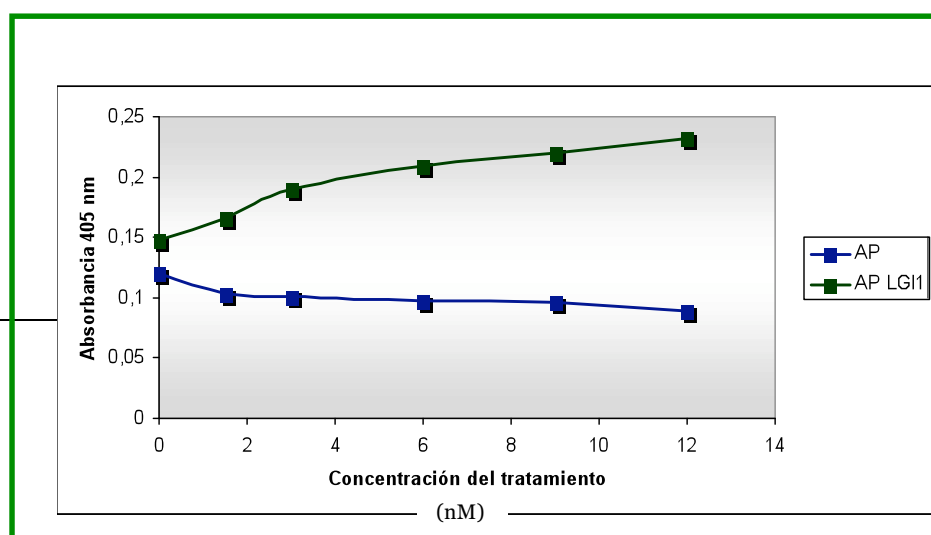


Figura 29. LGI1 no se expresa en OLN93. RT-PCR en la que se aprecia que LGI1 se expresa en células P8 y CGN, pero no el OLN93. A la derecha de la imagen se encuentra la expresión de actina. Como control negativo (C-) se utilizó agua. CGN; neuronas granular de cerebelo de rata.

Después quisimos demostrar si el posible receptor de LGI1 estaba presente en este tipo celular y si LGI1 era capaz de unirse de forma dosis dependiente a las OLN93. Efectivamente, la **figura 30** muestra como medio condicionado enriquecido en AP-LGI1 proveniente de células HEK 293T transfectadas transitoriamente, era capaz de unirse de forma dosis dependiente a la superficie de las células OLN93.



Resultados y Discusión

Figura 30. Curva de unión dependiente de dosis de AP-LGI1 a la superficie de las células OLN93. AP binding con concentraciones creciente de AP/AP-LGI1 sobre células OLN93. Se representa concentración de medio condicionado frente a Absorbancia a 405 nm proveniente del sustrato pNPP normalizada entre condiciones dividiendo por los mg totales de proteína en el ensayo x 1000.

La incubación de estas células con medio enriquecido en LGI1-Flag o AP-LGI1 a diferentes tiempos y concentraciones, no mostró un cambio en la morfología de las células. Sin embargo, sí que encontramos diferencias en el porcentaje de células OLN93 vivas al cabo de 48 horas tratadas con medio enriquecido LGI1-Flag, comparado con el porcentaje células OLN93 incubadas con medio enriquecido con Flag.

Para medir la viabilidad celular se trabajó con el reactivo MTT. Este ensayo se basa en la propiedad del MTT de ser metabolizado por las mitocondrias de células vivas, siendo su producto el formazan. El MTT es de color amarillo pálido, mientras que el formazan es de color azul oscuro. Los cambios de absorbancia se miden a 495 nm y determinan la viabilidad celular del cultivo en cuestión. En la **figura 31** se muestra como el número de células vivas tratadas durante 48 horas con medio enriquecido LGI1-Flag es mayor que el número de células vivas tratadas durante 48 horas con medio enriquecido Flag. Ambos números son de todas formas, mayores que el porcentaje de células vivas tratadas con medio sin enriquecer.

1

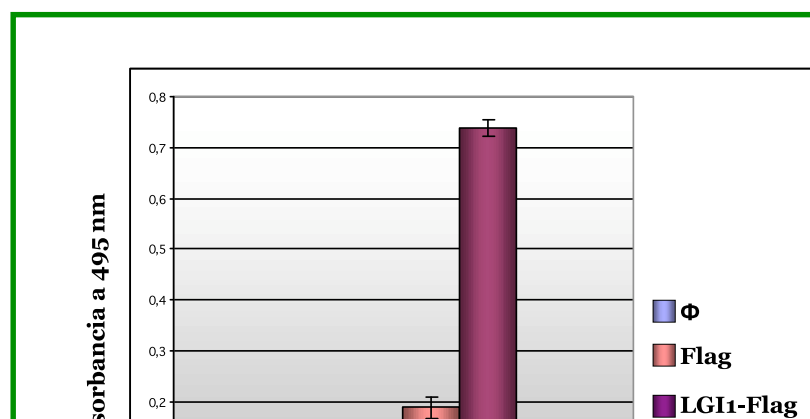


Figura 31. Diferencias en la absorbancia a 495 nm en células OLN93 incubadas con medio sin suero, medio enriquecido Flag y medio enriquecido LGI1-Flag. La incubación duró 48 horas, tras las cuales se añadió MTT y 24 horas después se midió la absorbancia.

Para comprobar que el aumento en la viabilidad celular de las OLN93 era debido a la presencia de proteína LGI1 unida al epítipo Flag en el medio, se llevó a cabo una inmunodepleción del medio. Esto es, se enriqueció medio Flag y LGI1-Flag a partir de transfecciones transitorias de HEK 293 T y una vez concentrado, se incubó ese medio durante 3 horas con bolas sepharosa G más anticuerpo anti Flag.

LGI1-Flag debería unirse a las bolas incubadas con el anticuerpo, de manera que si LGI1 aumenta la viabilidad celular de las células OLN93, el medio inmunodeplecionado (ID) ya no debería tener LGI1-Flag, así que no deberíamos observar la misma absorbancia con medio condicionado LGI1-Flag y medio condicionado inmunodeplecionado LGI1-Flag (LGI1-Flag ID).

Resultados y Discusión

Una vez transcurrido las 3 horas, se utilizó por una parte el medio para tratar a las células OLN93 y llevar a cabo un ensayo de supervivencia celular, y por otra parte, se añadió tampón de carga SB2X a las bolas sepharosa G y anticuerpo anti flag y se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot.

La **figura 32** muestra como la viabilidad celular baja considerablemente cuando el medio condicionado LGI1-Flag ha sido inmunodeplecionado (LGI1-Flag ID), y sin embargo, apenas hay cambios en el medio condicionado Flag (Flag) y medio condicionado inmunodeplecionado Flag (Flag ID).

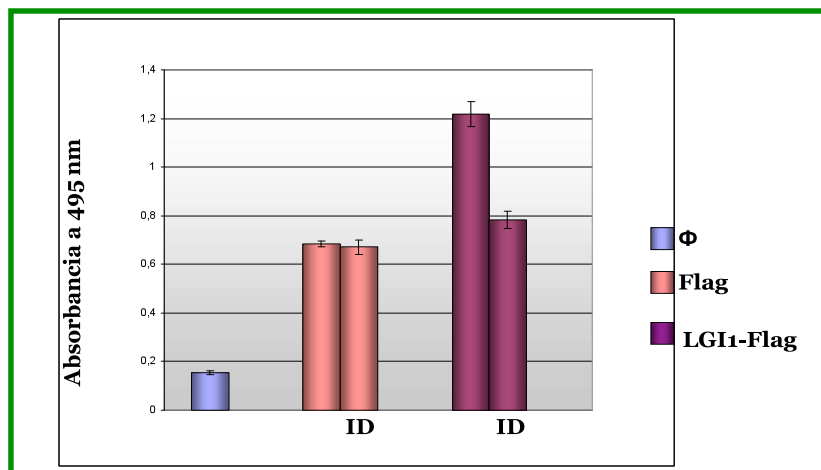


Figura 32. Diferencias en la absorbancia en células OLN93 tratadas con medios enriquecidos inmunodeplecionados (ID) y sin inmunodeplecionar.
La incubación duró 48 horas, tras las cuales se añadió MTT y 24 horas después se midió la absorbancia.

5 Bibliografía

Tabla xxx. Tipos de crisis epilépticas y estímulos precipitantes en las crisis reflejas (ILAE, 2001)

<i>Crisis autolimitadas</i>
Crisis generalizadas
Crisis tonicoclónicas
Crisis clónicas
Con soporte tónico
Sin soporte tónico
Ausencias típicas
Ausencias atípicas
Ausencias mioclónicas
Crisis tónicas
Espasmos
Crisis mioclónicas
Mioclonías palpebrales
Con ausencias
Sin ausencias
Crisis mioclónico-astáticas
Mioclono negativo
Crisis atónicas
Crisis reflejas en epilepsias generalizadas
Crisis focales
Crisis focales sensoriales
Con síntomas sensoriales elementales
Crisis focales motoras
Con signos motores clónicos elementales
Con Crisis motoras tónicas asimétricas
Con automatismos típicos
Con automatismos hipercinéticos
Con mioclono negativo focal
Con crisis motoras inhibitorias
Crisis gelásicas
Crisis hemiclónicas
Crisis secundariamente generalizadas
Crisis reflejas en las epilepsias focales
<i>Crisis continuas</i>
Estado de mal epiléptico generalizado
Status epilépticus generalizado tonicoclónico
Status epilepticus clónico
Status epilepticus de ausencia
Status epilepticus tónico
Status epilepticus mioclónico
Estado de mal epiléptico focal
Epilepsia parcial continua de Kojewnikov

Resultados y Discusión

Aura continua
Status epilepticus límbico
Status hemiconvulsivo con hemiparexia
<i>Estímulos precipitantes de las crisis reflejas</i>
Visuales
Luz intermitente
Patrón geométrico
Otros estímulos visuales
Pensamiento
Música
Alimentación
Praxis
Somatosensoriales
Propioceptivos
Lectura
Agua caliente
Sobresalto

Tabla X. Síndromes epilépticos y síndromes relacionados (ILAE, 2001)

Crisis neonatales benignas familiares
Encefalopatía mioclónica temprana
Síndrome de Ohtahara
Crisis parciales migratorias del lactante (*)
Síndrome de West
Epilepsia mioclónica benigna del lactante
Crisis familiares benignas del lactante
Crisis benignas del lactante (no familiares)
Síndrome de Dravet (antigua epilepsia mioclónica severa)
Síndrome HH (hemiconvulsión-hemiplejía)
Status mioclónico en encefalopatías no progresivas
Epilepsia benigna de la infancia con paroxismos centro-temporales
Epilepsia benigna occipital temprana (tipo Panayiotopoulos)
Epilepsia benigna occipital tardía (tipo Gastaut)
Epilepsia con ausencias mioclónicas
Epilepsia con crisis mioclónico-astáticas
Síndrome de Lennox-Gastaut
Síndrome de Landau-Kleffner
Epilepsia con punta onda continua durante el sueño
Epilepsia de ausencias infantiles
Epilepsias mioclónicas progresivas
Epilepsias generalizadas idiomáticas con fenotipos variables
Epilepsia ausencias juveniles
Epilepsia mioclónica juvenil
Epilepsia con sólo crisis tonicoclónicas generalizadas
Epilepsias reflejas
Epilepsia occipital idiomática fotosensible

Otras epilepsias sensibles a estímulos visuales
Epilepsia primaria de la lectura
Epilepsia del sobresalto
Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante
Epilepsia familiar del lóbulo temporal
Epilepsias generalizadas con crisis febriles plus (*)
Epilepsia familiar focal con focos variables (*)
Epilepsias focales sintomáticas
Epilepsias límbicas
Epilepsia temporal medial con esclerosis del hipocampo
Epilepsia temporal medial con etiología específica
Otros tipos definidos por la localización y la etiología
Epilepsias neocorticales
Síndrome de Rasmussen
Otros tipos definidos por la localización y la etiología
Condiciones que cursan con crisis epilépticas pero que no conllevan un diagnóstico de epilepsia
Crisis neonatales benignas
Crisis febriles
Crisis reflejas
Crisis por privación de alcohol
Crisis inducidas por drogas o sustancias químicas
Crisis postraumáticas precoces
Crisis aisladas o en racimo
Crisis repetidas ocasionalmente (oligolepsia)