

# Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Licenciatura en Biotecnología

## **Dimerización de la fosfatasa dual laforina: identificación y mutagénesis de aminoácidos implicados**

Pablo Sánchez Martín

DIRECTORES

Carlos Romá Mateo  
Pascual Sanz Bigorra

TUTORA

Lynne Paula Yenush

Septiembre, 2012





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE  
INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL**

**Anexo 4**

Autorización del director/a,  
codirector/a o tutor/a

**Datos del trabajo de fin de carrera**

Autor: Pablo Sánchez Martín

DNI: 26751712K

Título: Dimerización de la fosfatasa dual laforina: identificación y mutagénesis de aminoácidos implicados

Área o áreas de conocimiento a las que corresponde el trabajo: Biomedicina

Titulación: Licenciatura en Biotecnología

**A cumplimentar por el director/a, codirector/a o tutor/a del trabajo (Que imparte docencia en la ETSIAMN)**

Nombre y apellidos: Lynne Paula Yenush

Departamento: Biotecnología

En calidad de:  director/a  codirector/a  tutor/a

Autorizo la presentación del trabajo de fin de carrera cuyos datos figuran en el apartado anterior y certifico que se adecua plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido exigidos a un trabajo de fin de carrera, de acuerdo con la normativa aplicable en la ETSIAMN.

(Firma)\* Lynne Paula Yenush

Valencia, 3 de Septiembre de 2012

En el caso de codirección, han de firmar necesariamente los que sean profesores de esta Escuela; si existe tutor o tutora, tiene que ser éste quien firme esta autorización.

**DIRECCIÓN DE LA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE  
INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL**

## **Anexo 5**

Ficha resumen del Trabajo Fin de  
Carrera

### **Datos personales**

Nombre y apellidos: Pablo Sánchez Martín

### **Datos del trabajo de fin de carrera**

Título del TFC: Dimerización de la fosfatasa dual laforina: identificación y mutagénesis de aminoácidos implicados

Lugar de realización: IBV (CSIC)

Fecha de lectura:

Titulación: Licenciatura en Biotecnología

Especialidad:

Director/a: Carlos Romá Mateo

Codirector/a: Pascual Sanz Bigorra

Tutor/a: Lynne Paula Yenush

### **Resumen**

Laforina, una de las proteínas implicadas en la Enfermedad de Lafora (LD, OMIM 254780), presenta una estructura modular compuesta por un dominio de unión a carbohidratos y un dominio fosfatasa de especificidad dual. Aunque se ha propuesto su papel fisiológico como fosfatasa de carbohidratos, se ha descrito su interacción con malina, una E3 ubiquitina ligasa implicada también en la enfermedad. Esta interacción da lugar a la formación de un complejo funcional, implicado en muchos otros procesos independientes de la actividad fosfatasa de laforina, como la degradación vía proteasoma o la autofagia.

Se ha descrito que laforina es capaz de formar dímeros. En un primer momento se postuló que los monómeros de laforina eran inactivos y la dimerización necesaria para la actividad fosfatasa. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la actividad de laforina no depende de la dimerización, y que laforina está presente principalmente en forma monomérica. La función de los dímeros de laforina y su relación con la enfermedad de Lafora permanece oculta, aunque se ha descrito que la dimerización depende de las condiciones redox, sugiriendo que los puentes disulfuro están implicados en el proceso.

Utilizando mutagénesis dirigida hemos diseñado formas de laforina en que los residuos de cisteína han sido sustituidos por serina. Uno de estos mutantes (C329S) era incapaz de formar dímeros tanto en bacterias como en células de mamífero. Además, su actividad catalítica permanecía intacta, y sus niveles de expresión eran similares a los del tipo silvestre.

En conjunto, estos resultados sugieren que la cisteína 329 está implicada específicamente en la dimerización de laforina y por tanto el mutante C329S constituye una herramienta útil para analizar las implicaciones fisiológicas de la oligomerización de laforina.

### **Palabras clave**

Laforina, dimerización, Enfermedad de Lafora

## Resum

Laforina, una de les proteïnes implicades en la Malaltia de Lafora (LD, OMIM 254780), presenta una estructura modular composta per un domini d'unió a carbohidrats i un domini fosfatasa d'especificitat dual. Encara que s'ha proposat el seu paper fisiològic com a fosfatasa de carbohidrats, s'ha descrit la seua interacció amb malina, una E3 ubiquitina ligasa implicada també en la malaltia. Esta interacció dóna lloc a la formació d'un complex funcional, implicat en molts altres processos independents de l'activitat fosfatasa de laforina, com la degradació via proteasoma o l'autofàgia.

S'ha descrit que laforina és capaç de formar dímers. En un primer moment es va postular que els monòmers de laforina eren inactius i la dimerització necessària per a l'activitat fosfatasa. No obstant això, recentment s'ha descrit que l'activitat de laforina no depèn de la dimerització, i que laforina està present principalment en forma monomèrica. La funció dels dímers de laforina i la seua relació amb la malaltia de Lafora roman oculta, encara que s'ha descrit que la dimerització depèn de les condicions redox, suggerint que els ponts disulfur estan implicats en el procés.

Utilitzant mutagènesi dirigida hem dissenyat formes de laforina en que els residus de cisteïna han sigut substituïts per serina. Un d'estos mutants (C329S) era incapaç de formar dímers tant en bacteris com en cèl·lules de mamífer. A més, la seua activitat catalítica roman intacta, i els seus nivells d'expressió eren semblants als del tipus silvestre.

En conjunt, estos resultats suggerixen que la cisteïna 329 està implicada específicament en la dimerització de laforina i per tant el mutant C329S constitueix una eina útil per a analitzar les implicacions fisiològiques de l'oligomerització de laforina.

## Paraules clau

Laforina, dimerització, Malaltia de Lafora

## Abstract

Laforin, one of the proteins involved in Lafora Disease (LD, OMIM 254780), presents a modular structure composed by a carbohydrate-binding domain and a dual-specificity phosphatase domain. Although its physiological activity as a carbohydrate phosphatase has been proposed, the interaction with malin - an E3 ubiquitin ligase also involved in the disease - has been described. This interaction results in the formation of a functional complex, implicated in the regulation of many other processes unrelated to laforin's phosphatase activity, like proteasomal degradation and autophagy.

It has been described the capability of laforin to form dimers. Laforin monomers were first postulated to be inactive and the dimerization necessary for the phosphatase activity. However, it has been recently described that laforin activity does not depend on dimerization, and that laforin is present mainly as a monomeric form. The function of laforin dimers and their relation with LD remains unclear, although it has been described that dimerization depends on redox conditions, suggesting that disulphide bonds are involved in the process.

Using directed mutagenesis we have designed laforin forms in which cysteine residues have been replaced by serin. One of these mutants (C329S) was unable to form dimers both in bacterial and mammalian cells. Besides, its catalytic activity was not impaired, and the expression levels of the protein were similar to the wild type.

Taken together, these results suggest that cysteine 329 is specifically involved in the dimerization process of laforin and hence the C329S mutant constitutes a valuable tool in order to analyze the physiological implications of laforin's oligomerization.

## Key words

Laforin, dimerization, Lafora Disease

A mis padres, primeros y últimos responsables de que esté hoy aquí. A mi padre, que desde pequeño me despertó la pasión por las cosas pequeñas, desde los animales a las estrellas. A mi madre, que durante un año ha llevado el nombre de mi proyecto en el bolso para predicarlo ante familiares y panaderos. Si algún día alguien lo lee será gracias a ella.

A mis compañeros de carrera, porque si estos cuatro años me han formado como persona, ellos han influido en lo que soy. En especial, a mis Irene (todas mis bendiciones por cuatro años de tortura psicológica) y a Miguel (por las lecciones de humildad, y de la vida en general).

A Pascual, por aceptarme en su laboratorio siendo un mindundi sin pipetas. Por transmitirme su alegría cada vez que iba al trabajo, no os imagináis lo mucho que se valora eso.

A los laforinos, presentes y pasados. Después de todas las horas que hemos pasado juntos en el laboratorio son como una segunda familia.

Obviamente, a Carlos: de todo lo que me ha enseñado, este trabajo recoge solo una pequeña parte. Por mostrarme que la Fuerza está en todas partes (incluso en la bancada), que el hielo está frío y su pasión por la numerología. Por conseguir que después de la universidad, el conservatorio, el kungfu y las clases de inglés estuviera deseando ir al laboratorio. El quinto agradecimiento es para ti.

A Isabel, que aguantó todas mis quejas, in vivo e in silico, con una sonrisa (y qué sonrisa). Por las conversaciones transcendentales, las pullas cariñosas y la relatividad del tiempo.

Por los pipeteos a ritmo de Blues, las excursiones a la panadería y los seminarios musicales. Para todos aquellos que hayan oído hablar de “la forina” y quieran saber para qué carajo dimerizan las fosfatasas.





# ÍNDICE



INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1. Enfermedad de Lafora</b> .....	3
<b>2. Laforina</b> .....	6
2.1 Filogenia .....	7
2.2 Laforina como fosfatasa .....	8
2.3 Interacción laforina-malina .....	9
2.4 Dimerización de laforina .....	9
OBJETIVOS .....	13
MATERIAL Y MÉTODOS .....	17
<b>1. Cepas bacterianas</b> .....	19
<b>2. Colección de cebadores</b> .....	19
<b>3. Vectores de expresión</b> .....	20
<b>4. Purificación de laforina a partir de bacterias</b> .....	20
<b>5. Análisis de proteínas por <i>western blot</i></b> .....	20
<b>6. Ensayos fosfatasa <i>in vitro</i></b> .....	22
<b>7. Cromatografía de exclusión molecular</b> .....	22
<b>8. Cultivos de células de mamífero y transfecciones</b> .....	22
<b>9. Ensayos de ubiquitinación</b> .....	23
<b>10. Métodos bioinformáticos</b> .....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
<b>1. Análisis bioinformático</b> .....	29
<b>2. Análisis funcional de la cisteína 169</b> .....	31
<b>3. Análisis funcional de las cisteínas del dominio CBD</b> .....	33
<b>4. Análisis funcional de las cisteínas del dominio DSP</b> .....	35
<b>5. Caracterización del mutante C329S</b> .....	37
5.1 Análisis de dimerización mediante cromatografía de exclusión molecular .....	37
5.2 Expresión en células de mamífero .....	39
CONCLUSIONES .....	43
BIBLIOGRAFÍA .....	47

INTRODUCCIÓN

Figura 1.....	4
Cuerpos de Lafora	
Figura 2.....	6
Mutaciones conocidas en el gen de laforina	
Figura 3.....	7
Filogenia de laforina y malina	
Figura 4.....	10
Efecto de las condiciones de oxidoreducción en la dimerización de laforina	

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla I.....	19
Oligonucleótidos empleados para mutagénesis	
Tabla I.....	21
Lista de anticuerpos empleados en la inmunodetección por western blot de las proteínas analizadas	
Tabla III.....	24
Código identificativo de las secuencias empleadas en el alineamiento	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 5.....	30
Análisis bioinformático de laforina	
Figura 6.....	32
Análisis funcional de la forma mutante de laforina C169S	
Figura 7.....	34
Análisis funcional de los mutantes del dominio CBD de laforina	
Figura 8.....	36
Análisis funcional de los mutantes del dominio DSP	
Figura 9.....	38
Análisis del mutante C329S por cromatografía de exclusión molecular	
Figura 10.....	40
Estudio funcional del mutante C329S en células de mamífero	
Tabla IV.....	41
Resumen del trabajo	

BSA: Albúmina de suero bovino

CBD: Dominio de unión a carbohidratos

DSP: Dominio fosfatasa de especificidad dual

DTT: Ditioneitol

DMEM: Medio para cultivo de células de mamífero (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FBS: Suero fetal bovino

HA: Epítipo hemaglutinina

HEK: Células embrionarias de riñón humano

HRP: Peroxidasa de rábano

IPTG: Isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido

kDa: kiloDalton

LB: Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani

OMFP: 3-orto-metilfluorescein fosfato

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro

PTP: Proteína fosfatasa de tirosinas

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

Rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil Sulfato Sódico



<b>1 letra</b>	<b>3 letras</b>	<b>Aminoácido</b>
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparragina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina





# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Enfermedad de Lafora

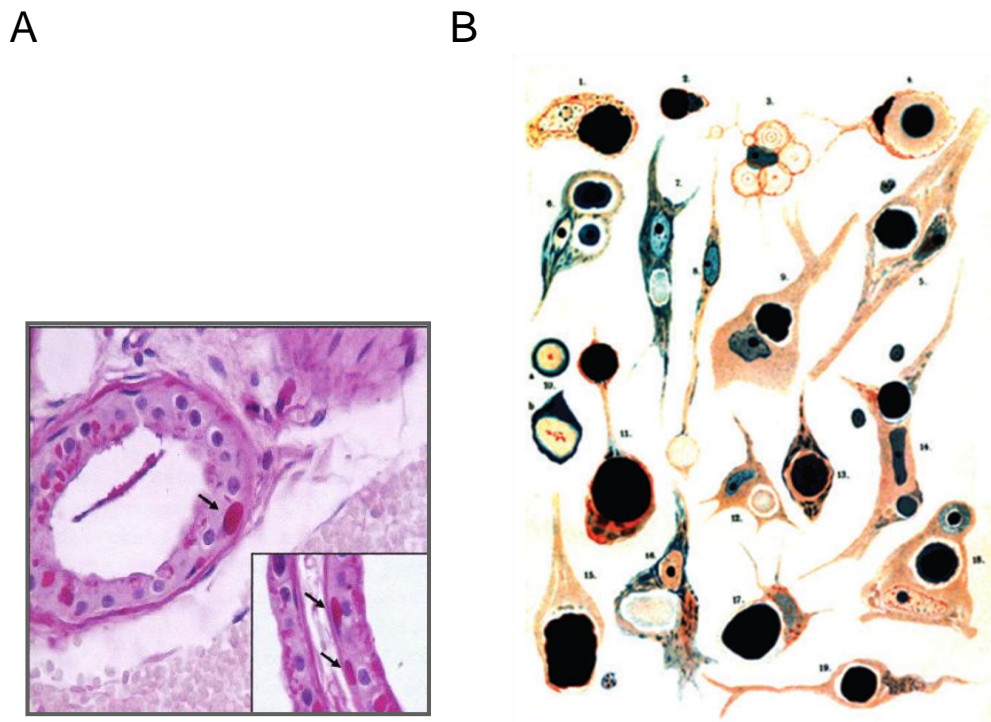
La enfermedad de Lafora (LD) es una epilepsia mioclónica progresiva de herencia autosómica recesiva, descrita por primera vez por el neurólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora en 1911 (Lafora and Glueck, 1911). Se trata de una enfermedad rara (prevalencia <5/10.000 personas) cuyos primeros síntomas aparecen durante la adolescencia, en forma de demencia progresiva y pérdida visual, seguidos de la degeneración del sistema nervioso central y finalmente la muerte del paciente durante la década siguiente a la aparición de los primeros síntomas (Gentry *et al.*, 2009; Tagliabracci *et al.*, 2007).

Hasta la fecha se han identificado dos genes implicados en la enfermedad: *EPM2A*, que codifica para la fosfatasa de especificidad dual laforina, y *EPM2B*, que codifica para la E3 ubiquitina ligasa malina. No obstante, las mutaciones en estos dos genes solo permiten explicar el 88% de los casos, mientras que el 12% restante no presenta mutaciones en ninguno de ellos. Esto ha llevado a hipotetizar sobre la implicación de un tercer *locus* en la enfermedad (Chan *et al.*, 2004).

Histológica y neurológicamente, los pacientes con mutaciones en los genes *EPM2A* y *EPM2B* resultan indistinguibles, lo cual sugiere que ambas proteínas están implicadas en las mismas rutas fisiológicas. A pesar de ello, los pacientes con mutaciones en el gen de laforina tienen un desarrollo clínico más severo y tienden a vivir menos tiempo que aquellos que presentan mutaciones en el gen de malina, sugiriendo la presencia de funciones independientes entre ambas proteínas (Gomez-Abad *et al.*, 2005).

Una de las características de la enfermedad es la presencia de acúmulos intracelulares de poliglucosanos en diversos tejidos de los pacientes. Estos acúmulos, denominados “cuerpos de Lafora” (*Lafora Bodies*, LB) (Figura 1) se pueden encontrar en piel, hígado, músculo cardíaco y esquelético, riñón, retina y médula espinal, así como en neuronas, donde fueron descritos inicialmente (Harriman *et al.*, 1955). A pesar de que esto sugiere una alteración en el proceso de síntesis o regulación del glucógeno, todavía se desconoce si son la causa de la enfermedad o una consecuencia de alteraciones previas.

Los cuerpos de Lafora están formados principalmente por unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos tipo  $\alpha$ -1-4 con ramificaciones en  $\alpha$ -1-6, pero a diferencia del glucógeno normal sus ramificaciones son menos numerosas y contienen una mayor cantidad de fosfato. Esto hace que los LB tengan una estructura similar a la amilopectina vegetal y que sean insolubles en agua. (Gentry *et al.*, 2012)



**Figura 1: Cuerpos de Lafora.** (A) Tinción PAS (*Periodic Acid Shift*) de una biopsia de piel proveniente de un paciente de LD. Adaptado de (Van heycoop Ten ham, 1974). (B) Imágenes realizadas por el Dr. Rodríguez Lafora a partir de sus observaciones en células de pacientes. Extraído de (Lafora and Glueck, 1911).

En principio se hipotetizó que laforina actuaba como fosfatasa de glucógeno, y que su ausencia daba lugar a un glucógeno hiperfosforilado, sobre el que el enzima ramificante no era capaz de actuar con normalidad; esto daría lugar a un glucógeno menos ramificado y de menor solubilidad, más similar al almidón vegetal (Tagliabracci *et al.*, 2007). Así, la causa de la muerte neuronal en los pacientes de enfermedad de Lafora sería la acumulación de estas formas alteradas de glucógeno. Sin embargo, esto no explica la participación de malina en el proceso de la enfermedad.

Una segunda hipótesis se basa en la capacidad de laforina y malina para formar un complejo funcional, en el que laforina se encargaría de dirigir a malina hacia los distintos sustratos (proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno) para que tuviera lugar su poliubiquitinación y degradación por el proteasoma. A este respecto se ha descrito la presencia de material ubiquitinado y productos glicosilados en los cuerpos de Lafora (Mittal *et al.*, 2007), lo cual sugiere la presencia de proteínas mal plegadas pendientes de degradación. Por ello, en ausencia de laforina o malina, la degradación de proteínas vía proteasoma está alterada. Esto tiene como consecuencia la acumulación de proteínas mal plegadas, que producen un efecto tóxico que desencadena estrés en el retículo endoplasmático y finalmente la muerte celular (Vernia *et al.*, 2009).

Otro proceso que también se ve afectado por la ausencia de laforina es la autofagia. Según estudios recientes en modelos murinos de la enfermedad, laforina es capaz de inducir la autofagia inhibiendo la vía de mTOR, una quinasa que bloquea la autofagia en función del estado energético de la célula. De este modo, la ausencia de laforina impide la correcta eliminación de material vía autofagia (Aguado *et al.*, 2010; Knecht *et al.*, 2010).

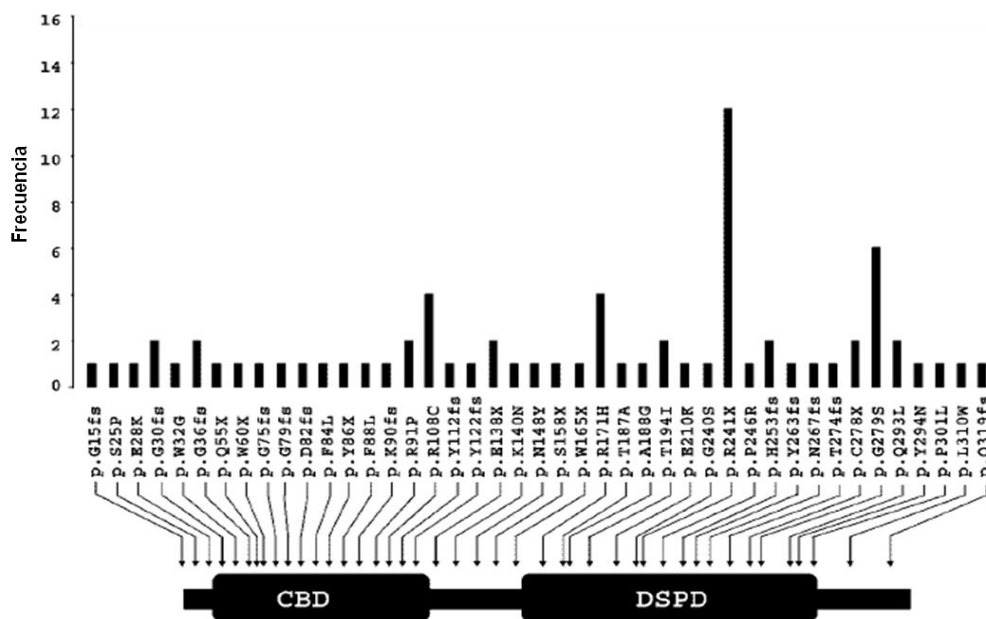
No obstante, es posible que tanto la actividad fosfatasa de carbohidratos de laforina como la unión y degradación de proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno estén alteradas en la enfermedad, dando lugar a la formación de cuerpos de Lafora (Gentry *et al.*, 2012). Además, la existencia de funciones de laforina independientes de su interacción con malina, podrían explicar por qué las mutaciones en este gen suelen tener un desarrollo clínico más severo.

Así pues, independientemente de qué alteración sea la causa primera de la enfermedad, ahondar en el estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de laforina es necesario para una mejor comprensión de las bases moleculares de esta patología.

## 2. Laforina

Laforina es una proteína fosfatasa de 331 aminoácidos formada por dos dominios: un dominio de unión a carbohidratos (CBD) en posición N-terminal, que permite su unión a glucógeno, y un dominio fosfatasa de especificidad dual (DSP) en posición C-terminal (Gentry *et al.*, 2012). Se ha observado que mutaciones localizadas en cualquiera de los dos dominios dan lugar a una pérdida de función, lo cual parece indicar que ambos dominios son necesarios para la actividad de laforina.

Laforina se expresa en todos los tejidos humanos, aunque los mayores niveles de expresión se encuentran en cerebro, músculo esquelético, corazón e hígado. Su expresión se incrementa tras el nacimiento, alcanzando el máximo durante la edad adulta (Ganesh *et al.*, 2001; Serratosa *et al.*, 1999). Actualmente se conocen alrededor de 50 mutaciones en el gen de laforina, destacando en la población española la prevalencia de la mutación R241X (Figura 2) (Singh and Ganesh, 2009).

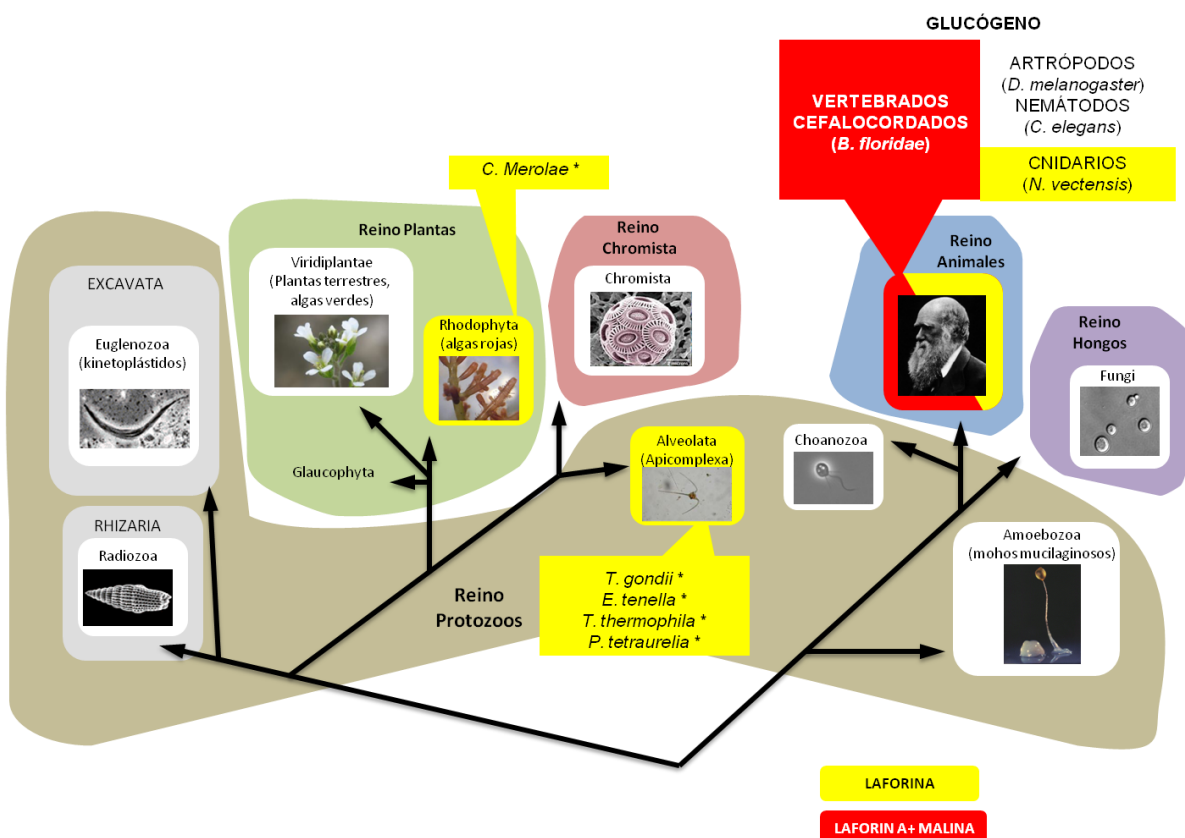


**Figura 2: Mutaciones conocidas en el gen de laforina.** En el diagrama se muestra la distribución de las mutaciones encontradas en familias con enfermedad de Lafora y su frecuencia (en función del número de familias independientes que la contienen). Adaptado de (Singh and Ganesh, 2009)

## 2.1 Filogenia

El gen de laforina está conservado en el genoma de todos los vertebrados, pero no se encuentra en la mayoría de invertebrados, incluyendo organismos modelo como levaduras, moscas y gusanos. No obstante, sí que se ha encontrado en algunos protozoos capaces de sintetizar un polisacárido insoluble similar a los cuerpos de Lafora (Gentry and Pace, 2009). Este resultado parece sugerir de nuevo una implicación de laforina en el metabolismo de carbohidratos.

En un análisis filogenético del gen de malina, se observó que aunque los ortólogos de esta proteína solo se encuentran en organismos que contienen laforina, ésta última aparece también en organismos más distantes evolutivamente (algas rojas, protozoos y cnidarios) (Figura 3). Estos resultados sugieren que laforina es capaz de actuar independientemente de malina, y que probablemente sus funciones actuales derivan de una función ancestral como fosfatasa de carbohidratos (Romá-Mateo *et al.*, 2011a).



**Figura 3: Filogenia de laforina y malina.** Esquema de la presencia de laforina (fondo amarillo) o laforina y malina (fondo rojo) en diferentes reinos eucariotas (según (Cavalier-Smith, 2004)). Los grupos que no contienen ninguna de las dos proteínas aparecen sobre fondo blanco. Se marca con un asterisco los organismos que almacenan polisacáridos insolubles. Adaptado de (Gentry *et al.*, 2012).

## 2.2 Laforina como fosfatasa

Dentro de las fosfatasas de especificidad dual (*Dual-Specificity Phosphatases*, DSPs) (capaces de defosforilar tanto tirosinas, como serinas/treoninas), laforina se encuentra clasificada en el grupo de las DSPs atípicas, siendo la única fosfatasa humana con dominio de unión a carbohidratos conocida hasta la fecha (Gentry *et al.*, 2009). Este tipo de fosfatasas basan su actividad en un residuo de cisteína en el centro catalítico y pertenecen a la superfamilia de las PTPs (*Protein Tyrosine Phosphatases*).

Estas fosfatasas presentan un mecanismo de acción muy conservado. El núcleo del dominio catalítico está formado por entre cuatro y cinco láminas beta, rodeadas por hélices alfa. El centro activo está formado por una región conservada denominada P-loop (*Phosphate binding-loop*), donde se encuentra el motivo catalítico consenso común a todas las DSPs (HCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>R(S/T))(Andersen *et al.*, 2001). Los aminoácidos de este motivo son los que determinan la estructura del surco catalítico, modificando la especificidad por el sustrato. En laforina, la cisteína catalítica se encuentra en la posición 266.

Se ha descrito que el estado de oxidorreducción de la cisteína catalítica es crítico para su actividad. Es necesario que la cisteína se encuentre reducida para que la fosfatasa sea activa, pudiendo llegar a inactivarse de forma irreversible si las condiciones de oxidación son intensas. De este modo, el estado de oxidación puede ser una forma de regular la actividad de las fosfatasas basadas en cisteína (den Hertog *et al.*, 2005; Denu and Tanner, 1998; Ross *et al.*, 2007).

A pesar de pertenecer a la familia de las DSPs, múltiples estudios han demostrado que laforina es capaz de defosforilar carbohidratos (Worby *et al.*, 2006), lo cual la estableció como miembro fundador de un nuevo grupo de proteínas: las fosfatasas de carbohidratos (Gentry *et al.*, 2012).



### 2.3 Interacción laforina-malina

Como ya se ha dicho anteriormente, laforina es capaz de unirse a malina, sirviendo de andamiaje frente a distintas proteínas implicadas en la síntesis del glucógeno. De este modo malina puede ubicuitinarlas y marcarlas para degradación, disminuyendo los niveles de glucógeno (Vilchez *et al.*, 2007).

Se ha comprobado que el papel de laforina como proteína adaptadora es independiente de su función como fosfatasa de carbohidratos, ya que el mutante catalíticamente inactivo C266S mantiene su capacidad de unirse a malina y dirigirla contra sus proteínas diana (Solaz-Fuster *et al.*, 2008).

Además, la interacción entre laforina y malina sirve como mecanismo de regulación de los niveles de laforina, ya que malina es capaz de ubicuitinarla para que sea degradada (Gentry *et al.*, 2005).

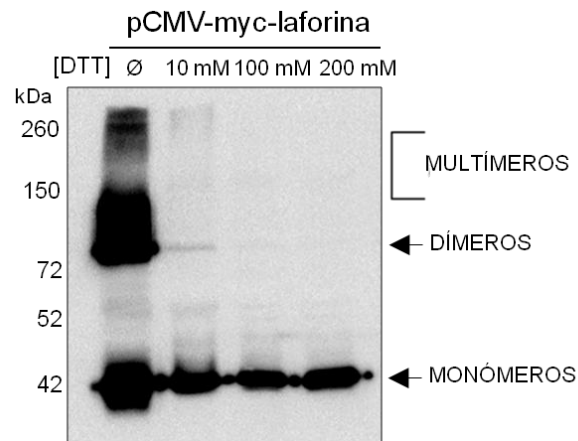
### 2.4 Dimerización de laforina

Se ha descrito que laforina purificada a partir de bacterias, cultivos celulares o tejidos es capaz de dimerizar (Castanheira *et al.*, 2010; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce esta dimerización todavía se desconoce. Aunque inicialmente se describió que la dimerización de laforina era necesaria para su actividad fosfatasa (Liu *et al.*, 2006), estudios recientes muestran que laforina en forma monomérica no solo es plenamente activa, sino que es la forma mayoritaria (Dukhande *et al.*, 2011).

Aunque se podría pensar en la dimerización como una forma de regulación de la actividad de laforina, en el estudio realizado por Dukhande *et al.* (Dukhande *et al.*, 2011) se comprobó que la dimerización no influía en la actividad fosfatasa (tanto sobre sustratos artificiales como sobre carbohidratos fosforilados), ni en la unión a glucógeno o a malina.

Al igual que sucede con la actividad catalítica, las condiciones de oxidorreducción parecen regular la dimerización de laforina, ya que la adición de un agente reductor como el DTT es capaz de impedir completamente la formación de dímeros (Figura 4). Sin embargo la ausencia de un agente reductor inhibe la actividad fosfatasa de laforina

y favorece su oligomerización. Así, la presencia de estrés oxidativo en el interior celular podría afectar a estos dos procesos (Dukhande *et al.*, 2011).



**Figura 4: Efecto de las condiciones de oxidoreducción en la dimerización de laforina.** Extractos de células HEK-293 transfectados con construcciones de myc-laforina fueron analizados empleando electroforesis en condiciones no reductoras y *western blot* con anticuerpos anti-laforina. La adición de cantidades crecientes de agente reductor impide la oligomerización de laforina, sugiriendo que los puentes disulfuro podrían ser la causa de la dimerización. Adaptado de (Dukhande *et al.*, 2011).

La presencia de discrepancias en la bibliografía respecto a la dimerización de laforina puede ser debida a la tendencia natural de esta proteína a formar agregados. Esto hace que en función del estado de oxidorreducción establecido en las condiciones experimentales, los resultados obtenidos puedan ser distintos.

La fuerte influencia del estado redox en la oligomerización de laforina podría indicar que la formación de puentes disulfuro juega un papel importante en la función de la proteína. No obstante, el mecanismo exacto por el que este proceso se produce permanece aún desconocido. En el presente trabajo estudiaremos qué cisteínas son necesarias para la formación de dímeros, así como su implicación en la funcionalidad de laforina y su posible relevancia para la enfermedad de Lafora.





## **OBJETIVOS**



El objetivo general de este trabajo es analizar la dimerización de laforina y su posible relevancia en el desarrollo de la enfermedad de Lafora. Para ello se plantean los siguientes puntos:

**I.-** Identificación y mutagénesis de cisteínas en laforina.

**II.-** Caracterización funcional de dichos mutantes: actividad fosfatasa, unión a carbohidratos y capacidad de dimerización.

**III.-** Estudio de las implicaciones de la dimerización en la función de laforina, a través de una forma mutante incapaz de dimerizar.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo fueron DH5 $\alpha$  para la clonación y amplificación de plásmidos y BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL (Stratagene) para la expresión y purificación de proteína recombinante. Esta última presenta modificaciones para facilitar la expresión de proteínas de otros organismos, incluyendo copias extra de varios tRNAs, además de un gen de resistencia a cloramfenicol.

Ambos tipos de bacterias se crecieron en agitación a 37°C, usando medio LB (peptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% a pH 7.5) suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y, en el caso de las BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL, añadiendo 33  $\mu$ g/ml de cloramfenicol.

Para la transformación bacteriana el método empleado fue la electroporación a 1700 V. Antes de sembrar en medio sólido con antibióticos se dejó crecer las bacterias transformadas durante 45 minutos en medio LB a 37°C, de modo que pudieran comenzar a expresar los genes de resistencia a antibiótico.

## 2. Colección de cebadores

Los oligonucleótidos empleados para la obtención de formas mutantes de laforina por PCR se recogen en la Tabla I, destacando en rojo el triplete mutado respecto a la secuencia original.

Mutación	Oligonucleótidos	Secuencia de aminoácidos mutada
C109S/C110S	AATGGACCTCATCATGACCGTTCTCTACTTACAATGAAAACAACCTG	N G P H H D R S S T Y N E N N L
	CAAGTTGTTTTTCATTGTAAGTAGAGGACGGTCATGATGAGGTCCATT	
C123S	AACTTGGTGGATGGTGTGTATCTCTCCCAATAGGACTGGATT	N L V D G V Y S L P I G H W I
	AATCCAGTGTCTATTGGGAGAGATACACACCATCCACCAAGTT	
C169S	CCAAATATCTGGCTGGGTAGCTCCCTCGTCAGGTGGAACATGTA	P N I W L G S C P R Q V E H V
	TACATGTTCCACCTGACGAGGGGAGCTACCCAGCCAGATATTTGG	
C205S	ATTGTACAGAATTCCTCAGGCTCTAACCCTACCCAGAGCCCATG	I V Q N S S G S N R Y P E P M
	CATGGGCTCTGGGTAGCGGTTAGAGCCTGAGGAATTCTGTACAAT	
C250S	CAGATGCTGCCCCAGGCGGTGCCCTGCTGCATGCGCTGTGGAG	Q M L P Q A V S L L H A L L E
	CTCCAGCAGCGCATGCAGCAGGGACACCCGCTGGGCGAGCATCTG	
C278S	GGCCGCTCCACCGCGGTGTCTGGGCTGGCTCCAGTATGTGATG	G R S T A A V S G W L Q Y V M
	CATCACATACTGGAGCCAGCCGGAGACAGCCGCGGTGGAGCGGCC	
C329S	ATAAGAATGCGGCCGACTACAGGCTAGACACAGAAGAACG	R S S V S S L *

Tabla I: Oligonucleótidos empleados para mutagénesis. Los cebadores se muestran en dirección 5'-3'.

### 3. Vectores de expresión

Los plásmidos empleados fueron pET21b+ (Novagen) para la expresión de proteína en bacterias y pCMV para la expresión en células de mamífero. En el caso del pCMV, se emplearon variantes con distintos epítomos (myc y HA) para diferenciar las distintas proteínas en el revelado por *western blot*.

### 4. Purificación de laforina a partir de bacterias

La proteína laforina fue purificada por afinidad con una resina de amilosa-*Sepharose* (New England Biolabs). Para ello, bacterias BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL fueron transformadas según se ha descrito previamente con las diferentes construcciones en pET21b+. Las bacterias fueron crecidas en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 33 µg/ml de cloramfenicol. Cuando la DO<sub>600</sub> alcanzó entre 0,5 y 0,8 unidades se indujo la expresión de la proteína de interés con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) 0,1 mM, 3 horas a 37°C. Tras esto, las bacterias se recogieron y resuspendieron en tampón de suspensión [PBS con cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), 2mM de PMSF y 0,2% de Triton X100 (SIGMA)], para a continuación lisarse mediante sonicación. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad con amilosa-*Sepharose*, para ser posteriormente eluidas por competición con 500mM de maltosa libre.

Una vez obtenidas, las muestras se separaron por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 10%. La cuantificación se realizó mediante tinción con azul de Coomassie [Coomassie 0,25% (p/v), metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] y un patrón con cantidades conocidas de BSA (albúmina de suero bovino). Los lavados posteriores a la tinción se realizaron con metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

### 5. Análisis de proteínas por *western blot*

Las proteínas se analizaron empleando la metodología *Western Blot* descrita en “*Current Protocols in Protein Science*” (Coligan, 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE usando geles con un 10% de poliacrilamida y de un grosor de 1,5 mm. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 2-x [Tris·HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditiotreitól (DTT) 31 mg/mL] y se hirvieron durante 5 minutos. En el caso de los geles en condiciones

nativas se empleó tampón de carga sin SDS ni DTT y las muestras se cargaron sin hervir.

Para la electroforesis se empleó un sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad) a una resistencia constante de 15-20 miliamperios en tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v).

A continuación se transfirió el gel a una membrana de PVDF (*Immobilon Transfer Membranes*, Millipore) durante 90 minutos a una diferencia de potencial de 100 voltios, en tampón compuesto por glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v).

La membrana transferida se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, *Tween-20* 0,1 % (v/v)] durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla II) disuelto en la misma solución de leche en polvo y TBS-T empleada para el bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Para eliminar los restos de anticuerpo se realizaron tres lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno, tras lo cual las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a HRP durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados más con TBS-T, las membranas se revelaron con ECLprime (GE Healthcare) y se procesaron con un equipo Fuji LAS 4000mini (Fujifilm).

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Tipo	Anticuerpo Secundario
<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>Anti-HA</b>	Roche	1:5000	monoclonal	Anti-ratón
<b>Anti-Laforina 3.5</b>	Santiago Rodriguez	1:1000	monoclonal	Anti-ratón
<b>Anti-myc</b>	SIGMA	1:10000	monoclonal	Anti-ratón
<b>Anticuerpo secundario</b>				
<b>Anti-Mouse-HRP</b>	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	Policlonal	

**Tabla II:** Lista de anticuerpos empleados en la inmunodetección por *western blot* de las proteínas analizadas.

## 6. Ensayos fosfatasa *in vitro*

Los ensayos se realizaron empleando el sustrato artificial 3-orto-metilfluoresceín fosfato (OMFP, Sigma), con una concentración final de 0,5 mM de OMFP en 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 10 mM DTT. El ensayo se realizó sobre un volumen final de 200  $\mu$ L, utilizando 1  $\mu$ g de proteína, en placas ELISA multipocillo a 37°C. La hidrólisis del OMFP se midió como incremento de absorbancia a 490 nm, en un lector de placas Wallac 1420, PerkinElmer.

La actividad fosfatasa se expresó como unidades de absorbancia a 490 nm por microgramo de proteína y minuto de reacción. Se relativizó utilizando la actividad del tipo silvestre como 100% y las gráficas se representaron utilizando el software *Graphpad Prism 5.0* ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

## 7. Cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas recombinantes fueron purificadas en un equipo *AKTA Purifier* con una resina Superdex™ 200 10/300 gL (ambos de GE Healthcare). Las muestras fueron suspendidas previamente en tampón con 100 mM Tris a pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.5% y cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Para el calibrado se realizó una curva patrón a partir de los volúmenes de retención de las siguientes sustancias de masa molecular conocida: Dextrano (2000 kDa),  $\beta$ -amilasa (200 kDa), BSA (66 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa) y Citocromo C (12,4 kDa). A partir de ella se calculó la masa molecular de las proteínas al conocer su volumen de retención, extrapolando en la recta patrón.

## 8. Cultivos de células de mamífero y transfecciones

Las células empleadas en el presente trabajo fueron HEK-293 (células embrionarias de riñón humano), crecidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo, conteniendo 4,5 g/L de glucosa, 10% (v/v) de FBS inactivado por calor y suplementado con glutamina 2mM, 100  $\mu$ g/ml penicilina y 100 $\mu$ g/ml estreptomycin.

Las células fueron crecidas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en atmósfera húmeda. Los pases realizados para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron mediante tripsinización con Tripsina-EDTA.

La transfección se realizó con LIPOFECTAMINA 2000TM. Se empleó una mezcla de 1 µg/p60 y 3 µg/p100 de DNA con 2 µl/p60 y 6 µl/p60 de LIPOFECTAMINA 2000TM, siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla de transfección se dejó actuar durante 3,5 horas. Tras este tiempo, se cambió a medio DMEM completo y se dejó crecer las células durante 24 h más. Transcurrido este tiempo se lisaron las células en tampón de lisis (150mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM EDTA, 0,6M de sacarosa, 50mM NaF, 5 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM fenilmetilsulfonil-fluoruro, 0,5% NP40 e inhibidores de proteasas). Los lisados se recogieron con un rascador de plástico y se homogeneizaron con una jeringa de 0,5 x 16 mm (V 1mL).

Las proteínas del lisado se cuantificaron por el método de Bradford (Dc Protein Assay, Bio-Rad).

### **9. Ensayos de ubiquitinación**

Para la realización de este ensayo se empleó una construcción de ubiquitina modificada con un epítipo de seis histidinas en el extremo N-terminal (6xHis-UB (Kaiser and Tagwerker, 2005)). Esta modificación permite la purificación de proteínas ubiquitinadas por cromatografía de afinidad con una resina de cobalto (TALON, resina Clontech).

Placas p100 de células HEK-293 se transfectaron con los plásmidos de interés (incluida la construcción de ubiquitina) utilizando LIPOFECTAMINA 2000TM.

Las células se recogieron empleando un medio desnaturante que evita la acción de las deubiquitinasas (Cloruro de Guanidinio 6M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M, Tris-HCl 0,1M pH 8). Para separar las células de la placa se empleó un rascador de plástico y el lisado obtenido se homogeneizó con jeringas de 0,5 x 16 mm (V 1mL).

A continuación las muestras se clarificaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos, recogándose la fracción soluble y cuantificándose el contenido proteico. El volumen de extracto total correspondiente a 1,5 mg de proteína se incubó en rotación con 100 µL de la matriz de cobalto, durante 3 h a temperatura ambiente, en un volumen total de cada muestra de 1mL, con una concentración de imidazol de 10mM.

Tras la incubación se lavó la resina una vez con tampón B (Cloruro de Guanidinio 6M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M, Tris-HCl 0,1M pH 8 y 10mM de Imidazol) y cuatro con tampón C (Urea 8M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M, Tris-HCl 0,1M pH 8 y 10mM de Imidazol). La duración de los lavados fue de 15 minutos.

Por último, las proteínas retenidas en la resina se solubilizaron con tampón de carga y se visualizaron por *western blot*.

## 10. Métodos bioinformáticos

Para el análisis de secuencias se creó un alineamiento múltiple utilizando las siguientes entradas de la base de datos UniprotKB (2012) (Tabla III):

Uniprot ID	organismo
EPM2A_HUMAN	<i>Homo sapiens</i>
A5PK37_BOVIN	<i>Bos taurus</i>
EPM2A_CANFA	<i>Canis familiaris</i>
EPM2A_RAT	<i>Rattus norvegicus</i>
EPM2A_MOUSE	<i>Mus musculus</i>
Q5ZL46_CHICK	<i>Gallus gallus</i>
Q6GPD8_XENLA	<i>Xenopus laevis</i>
Q4S6Z3_TETNG	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
A7SVW9_NEMVE	<i>Nematostella vectensis</i>
B6KIB6_TOXGO	<i>Toxoplasma gondii</i>

Tabla III: Código identificativo de las secuencias empleadas en el alineamiento.

Se alineó la secuencia de aminoácidos utilizando ClustalW (Larkin et al., 2007) y el alineamiento final fue editado manualmente con BioEdit (Hall, 1999). La creación de los modelos de estructuras tridimensionales utilizados se describe en (Roma-Mateo et al., 2011b).







## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. Análisis bioinformático

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio sugerían la implicación de puentes disulfuro en la dimerización de laforina. Por ello, se realizó un alineamiento múltiple para localizar los aminoácidos de cisteína más conservados en la secuencia primaria de laforina (Figura 5A). De las nueve cisteínas presentes en la laforina humana (Figura 5B), solo la posición de dos de ellas se encuentra conservada en todos los organismos, la C169 y la C266. De ellas, la cisteína 266 ha sido estudiada extensamente en la literatura, ya que se trata de la cisteína catalítica. Esto explica el alto grado de conservación tanto de la cisteína como de la región adyacente, ya que constituye el sitio catalítico consenso de la familia de las DSPs. Estudios previos muestran que la mutación de dicha cisteína no impide la formación de dímeros (Liu *et al.*, 2006). La otra cisteína conservada, la C169, también estaba presente en todos los organismos estudiados y localizada en una región altamente conservada.

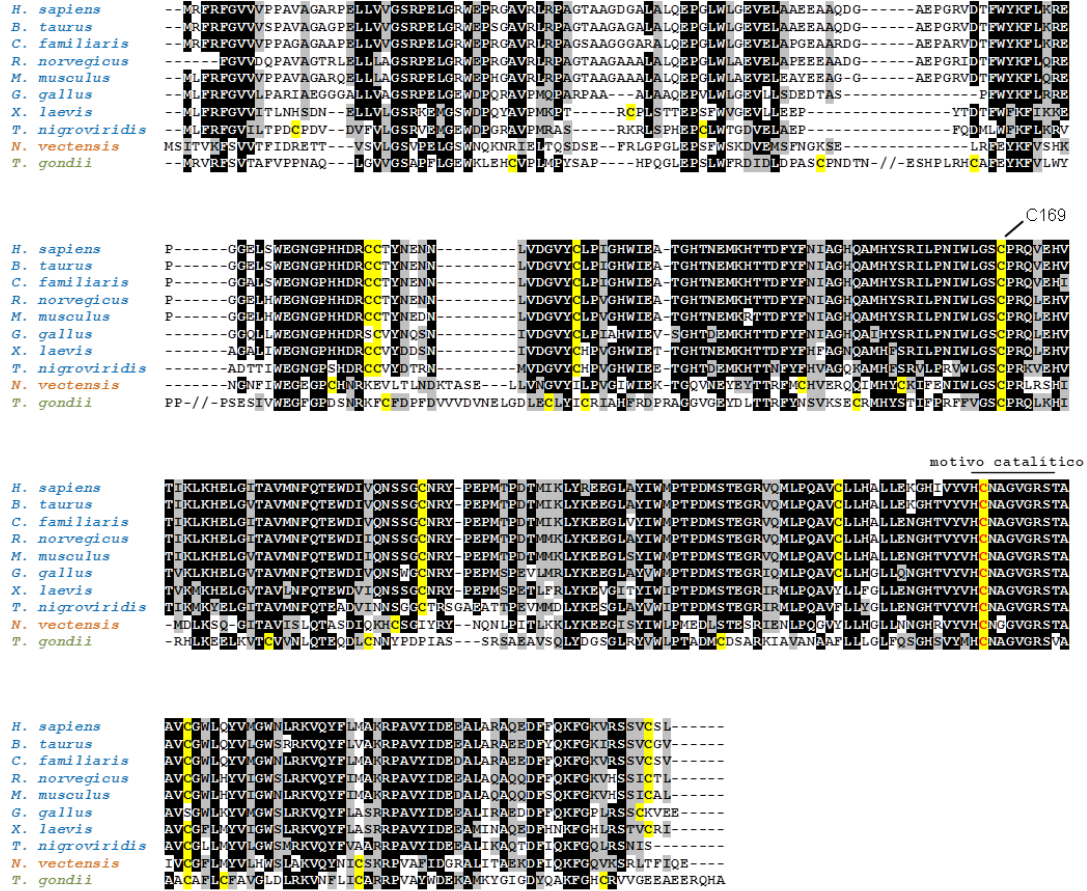
Para estimar la posible localización de las distintas cisteínas en la estructura terciaria de laforina, se utilizó un modelo estructural previamente creado en nuestro laboratorio (Romá-Mateo *et al.*, 2011b) (Figura 5C). Dado que laforina está constituida por dos dominios muy diferentes estructuralmente, cada uno de ellos se modeló de manera independiente. Por tanto, aunque estos modelos estructurales no nos permiten estimar la posición de un dominio respecto al otro, facilitan la localización de las cisteínas en cada uno de los dominios de la proteína. En ellos se observa que la cisteína 169 está situada en una posición expuesta en la estructura, lo cual le permitiría interactuar con cisteínas de otros monómeros de laforina.

Tanto por su grado de conservación como por su localización estructural, se decidió utilizar la cisteína 169 para analizar su posible implicación en la dimerización de laforina.

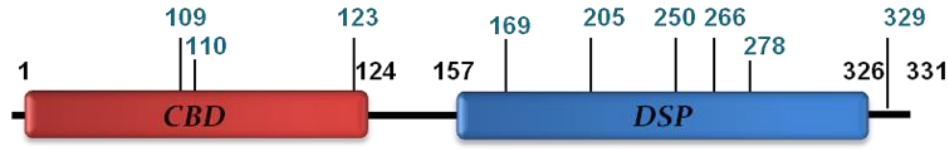
---

**Figura 5. Análisis bioinformático de laforina.** (A) Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de ortólogos de laforina en distintos organismos. Se emplearon secuencias de vertebrados (azul), un invertebrado (naranja) y un protozoo (verde) (los códigos de las secuencias se recogen en material y métodos). Se destaca en amarillo las distintas cisteínas y se indica la 169. Se muestra en rojo la cisteína catalítica (266). (B) Esquema de los dominios de laforina. Se muestra en azul la posición aproximada de las nueve cisteínas, indicando a qué dominio pertenecen (CBD: dominio de unión a carbohidratos; DSP: dominio fosfatasa dual). (C) Predicción de la estructura terciaria de los dominios CBD (izquierda) y DSP (derecha) de laforina. Aparecen en gris los triptófanos del CBD responsables de la unión a carbohidratos. Se destaca en rojo las cisteínas identificadas en el análisis. Nótese la ausencia de aquellas cisteínas situadas en regiones sin homología estructural frente a los modelos utilizados (cisteínas 123, 205 y 329). Figura realizada con PyMOL (<http://www.pymol.org>).

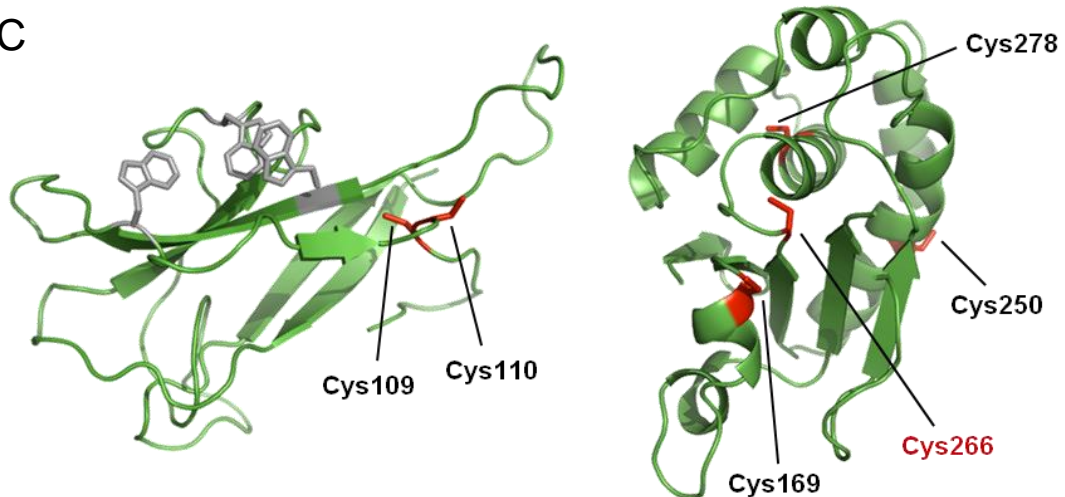
A



B



C



## 2. Análisis funcional de la cisteína 169

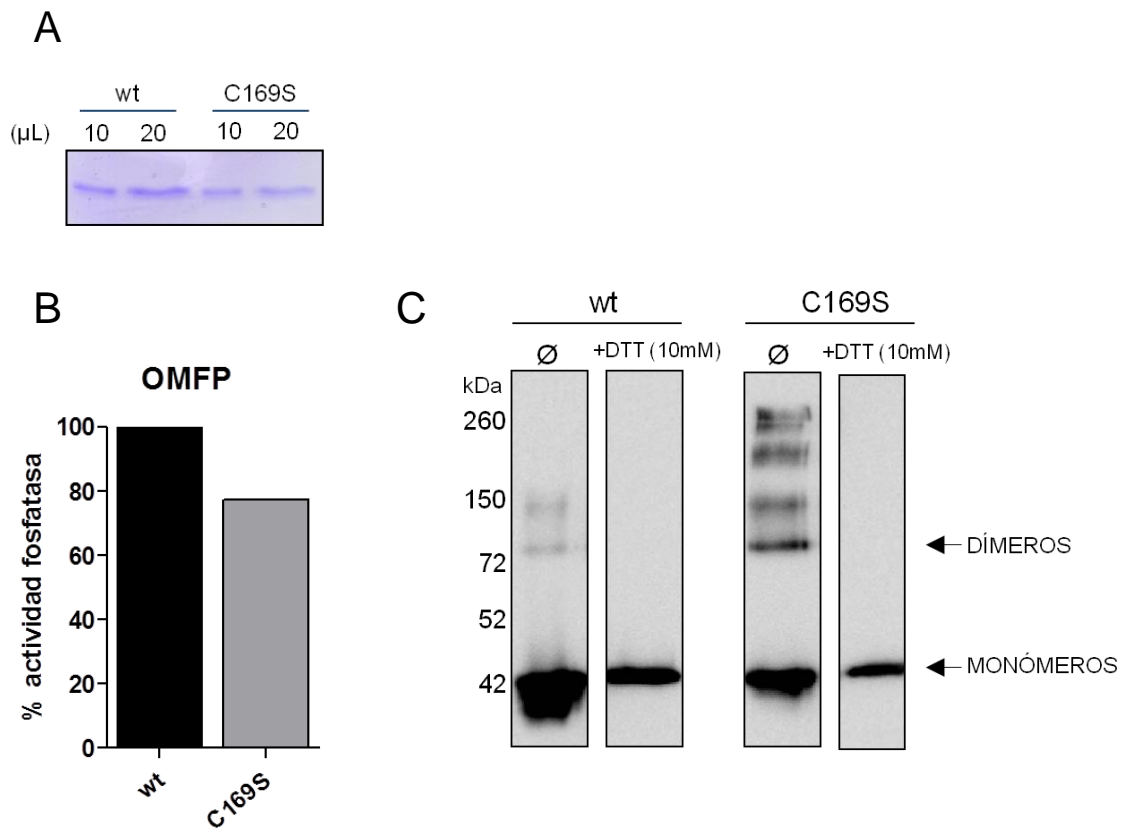
Para estudiar si esta cisteína participaba en la formación de puentes disulfuro, se realizó mutagénesis por PCR para sustituirla por serina. Con esta mutación se elimina el grupo sulfhidrilo, responsable de la formación de puentes disulfuro, manteniendo propiedades similares en cuanto a estructura, tamaño y polaridad. Una vez obtenido este primer mutante se ensayó su expresión en comparación con el tipo silvestre. Para ello la proteína recombinante expresada en bacterias se purificó empleando una resina de amilosa (ver material y métodos), eluyendo después por competencia con sustrato libre (maltosa). Esta forma de purificar permite comprobar la funcionalidad del dominio CBD, ya que si la proteína puede unirse a la resina significa que mantiene su capacidad de unión a carbohidratos. La proteína purificada se separa electroforéticamente para comparar el nivel de expresión con el tipo silvestre. La forma mutante C169S presentaba la misma movilidad electroforética que la proteína sin modificar, aunque sus niveles de expresión eran ligeramente menores (Figura 6A).

A continuación, se empleó proteína purificada obtenida por el mismo método para comprobar la capacidad catalítica del mutante, mediante ensayo de actividad fosfatasa *in vitro* sobre el sustrato artificial OMFP. La hidrólisis de este sustrato produce un producto coloreado, de modo que la variación de absorbancia en el tiempo puede ser medida para cuantificar la actividad fosfatasa de la proteína estudiada. Como se puede observar en la figura 6B, el mutante C169S es catalíticamente activo, aunque su actividad como fosfatasa es ligeramente menor que la del tipo silvestre.

En paralelo, se analizó la capacidad de dimerización *in vitro* del mutante C169S. Se ha descrito en la bibliografía que el DTT impide la formación de dímeros en laforina (Dukhande *et al.*, 2011), atribuyéndose este efecto a su acción reductora, que eliminaría los puentes disulfuro que mantienen unidos los monómeros de laforina. Por ello, para estudiar la capacidad de dimerización *in vitro* empleamos geles de acrilamida en condiciones no reductoras (ausencia de DTT y SDS en el tampón de carga; ver material y métodos). El mutante C169S mostró una capacidad de dimerización similar a la del tipo silvestre, mientras que la adición de DTT inhibió completamente la formación de formas diméricas (figura 6C). Se observó también una mayor tendencia a formar agregados en la forma mutante de laforina, posiblemente debidos a una mayor inestabilidad de su estructura.

A pesar de estar situada en una región altamente conservada y expuesta al solvente según la predicción estructural, la cisteína 169 no parece estar implicada en el proceso de dimerización de laforina. Sin embargo, la conservación de dicha cisteína puede ser debida a su presencia en un dominio de importancia estructural, lo cual explicaría el ligero descenso en los niveles de expresión y en la actividad fosfatasa observados tras su mutación.

Tras esta aproximación inicial, decidimos realizar la mutagénesis del resto de cisteínas.



**Figura 6. Análisis funcional de la forma mutante de laforina C169S.** (A) Ensayo de expresión del mutante C169S. Las muestras purificadas mediante resina de amilosa se analizaron por electroforesis seguida de tinción con azul Coomassie. (B) Estudio de la actividad fosfatasa *in vitro* frente a OMFP, siguiendo las condiciones de reacción descritas en material y métodos. (C) Ensayo de dimerización *in vitro* del mutante C169S. Las muestras purificadas utilizadas en el ensayo fosfatasa se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras (ausencia de SDS en el tampón de carga y sin hervir las muestras), seguido de inmunodetección con anticuerpos anti-laforina. Se empleó DTT y se hirvieron las muestras para inhibir la formación de dímeros.



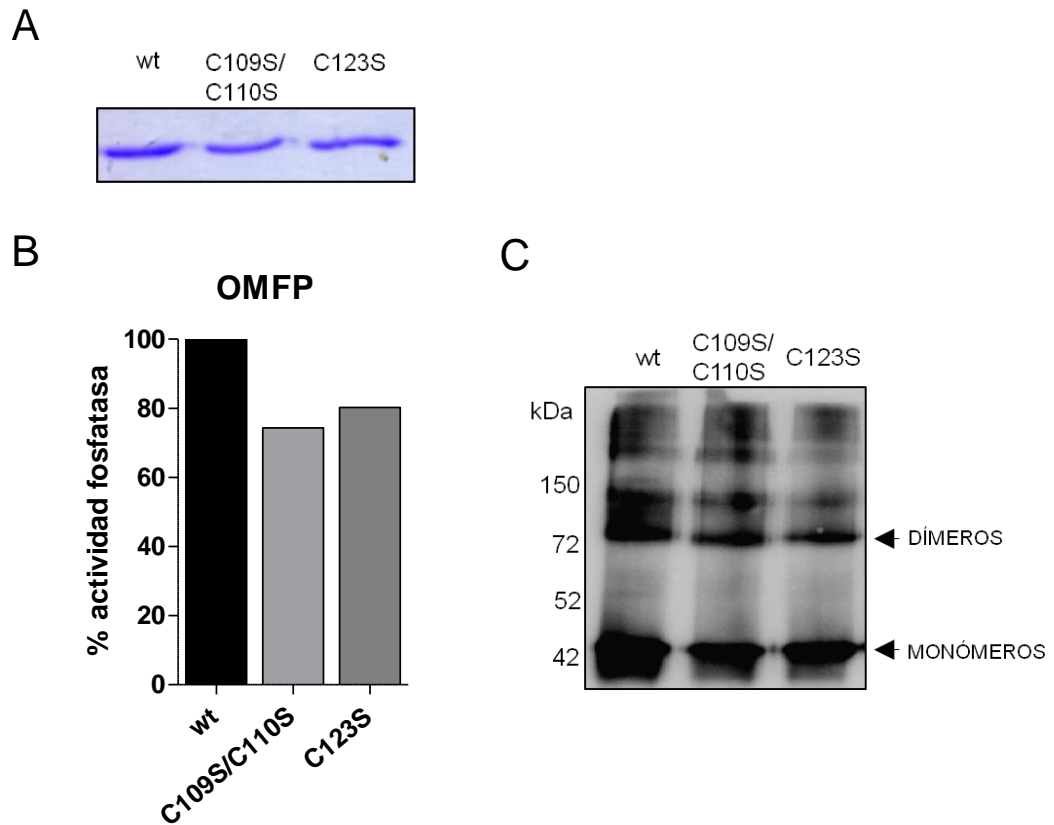
### 3. Análisis funcional de las cisteínas del dominio CBD

El dominio CBD presenta 3 cisteínas, situadas en las posiciones 109, 110 y 123. Debido a la proximidad de las dos primeras, se decidió realizar un mutante doble que englobara a ambas. Con esta estrategia se pretendía evitar que la adyacente pudiera realizar la interacción en su lugar. Este mutante C109S/C110S, junto con el C123S, constituyeron el objeto de estudio de esta parte del trabajo.

Una vez obtenidos los mutantes por PCR, se empleó la misma metodología que en el apartado anterior para caracterizarlos. Como se muestra en la figura 7A, los mutantes de este dominio presentaban niveles de expresión similares a los del tipo silvestre. Respecto a su actividad fosfatasa, ambos mutantes presentan una disminución similar de la actividad fosfatasa *in vitro* en comparación con el tipo silvestre, a pesar de lo cual siguen siendo catalíticamente activos (Figura 7B). Estas variaciones en la actividad producidas por mutaciones en un dominio distinto al catalítico podrían ser debidas a las alteraciones estructurales derivadas del cambio de aminoácido, efecto que ha sido ampliamente descrito en la literatura (Roma-Mateo et al., 2011b).

A continuación se empleó proteína purificada para comprobar la capacidad de dimerización *in vitro* de estas formas mutantes. Para ello se realizó una electroforesis en condiciones no reductoras en la que se observó que los mutantes C109S/C110S y C123S son capaces de dimerizar a niveles muy similares a los del tipo silvestre (Figura 7C).

Estos resultados sugieren que las cisteínas presentes en el dominio CBD no están implicadas en la dimerización de laforina. Por tanto, de todas las posibles orientaciones que pueden tomar los monómeros de laforina para dimerizar, es poco probable que el proceso esté guiado por el dominio CBD, ya sea una unión heterogénea CBD-DSP o entre dos dominios CBD. Apoya esta hipótesis el hecho de que en la bibliografía se ha descrito que tanto monómeros como dímeros se unen a carbohidratos con la misma afinidad (Dukhande *et al.*, 2011). Esto sugiere que los aminoácidos implicados en la dimerización de laforina no afectan a la conformación de las regiones del CBD implicadas en unión a carbohidratos.



**Figura 7. Análisis funcional de los mutantes del dominio CBD de laforina. (A)** Ensayo de expresión de los mutantes C109S/C110S y C123S. Las muestras purificadas mediante resina de amilosa se analizaron por electroforesis seguida de tinción con azul Coomassie. **(B)** Ensayo de la actividad fosfatasa *in vitro* empleando el sustrato artificial OMFP. **(C)** Ensayo de dimerización *in vitro* de los mutantes C109S/C110S y C123S. Electroforesis en condiciones no reductoras de proteína purificada, seguida de inmunodetección por *western blot* con anticuerpos anti-laforina.

#### 4. Análisis funcional de las cisteínas del dominio DSP

Una vez analizado el papel del dominio CBD en la formación de dímeros, el estudio se centró en las cisteínas localizadas en el dominio DSP. Este dominio presenta seis cisteínas, situadas en las posiciones 169, 205, 250, 266, 278 y 329. De ellas, la 169 ya ha sido estudiada en el apartado 1, mientras que la cisteína catalítica (C266) ya se había estudiado en la literatura previa y se había comprobado que no estaba implicada en la dimerización (Liu *et al.*, 2006). Por ello, en este apartado nos centramos en el estudio de las otras cuatro.

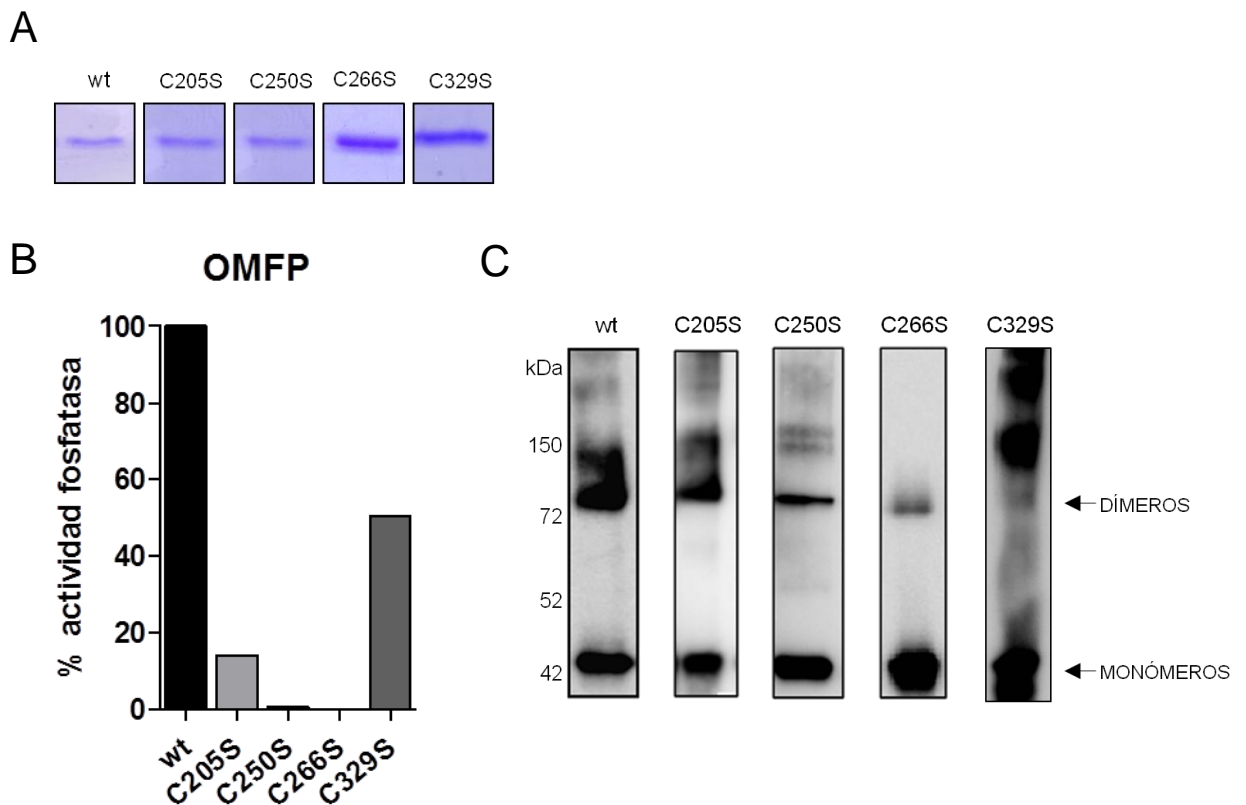
Los ensayos de expresión (figura 8A) muestran que los mutantes C205S, C250S y C329S se expresaban y purificaban correctamente. Sin embargo, el mutante C278S no se purificaba por esta técnica. Como hemos dicho anteriormente, el método de purificación empleado consiste en una resina de amilosa a la que se une laforina mediante su dominio CBD. Por tanto, la ausencia de esta forma mutante en la fracción purificada podía deberse a que la mutación produjera una alteración conformacional que impidiera la unión del CBD a la resina. Para comprobar si teníamos este problema en la purificación se analizaron los extractos totales por *western blot*, utilizando un anticuerpo específico anti-laforina. Sin embargo, pese a que la expresión del resto de formas mutantes era correcta, no se observaba la banda correspondiente al mutante C278S (datos no mostrados). También se probó a expresar el mutante C278S en levaduras, aunque sin éxito (datos no mostrados).

La ausencia total de expresión de laforina al mutar este residuo puede ser debida a que el cambio de aminoácido produzca alteraciones estructurales que la dirijan directamente a degradación. Como se mostró previamente en la figura 5C, la posición C278 está embebida en el centro de la estructura predicha de laforina, por lo que una alteración en este punto podría desestructurar completamente a la proteína. Tampoco podemos descartar que el cambio de nucleótido en la secuencia génica produzca alteraciones a nivel de transcripción que impidan que la proteína se traduzca.

A continuación se empleó proteína purificada para analizar la actividad fosfatasa *in vitro* de los tres mutantes expresados (Figura 8B). Los mutantes C205S y C250S presentaron una actividad catalítica baja, siendo la del mutante C250S prácticamente nula. El mutante C329S, pese a ver su actividad disminuida en comparación con el tipo silvestre, seguía siendo catalíticamente activo. El grado variable de reducción de la

actividad en los distintos mutantes puede ser debido a alteraciones estructurales derivadas de la mutagénesis.

Por último, se midió la capacidad de dimerización *in vitro* en condiciones no reductoras de los distintos mutantes, empleando la metodología ya explicada (Figura 8C). Se observó que los mutantes C205S y C250S eran capaces de formar dímeros. En cambio, el mutante C329S no mostró capacidad de formación de dímeros. Las tres formas mutantes, independientemente de su grado de dimerización, parecían presentar una mayor tendencia a formar agregados. Esto puede deberse a una mayor inestabilidad de su estructura.



**Figura 8: Análisis funcional de los mutantes del dominio DSP. (A)** Ensayos de expresión de las formas mutantes C205S, C250S, C266S y C329S. Las muestras purificadas mediante resina de amilosa se analizaron por electroforesis seguida de tinción con azul Coomassie. **(B)** Ensayo de la actividad fosfatasa *in vitro* empleando el sustrato artificial OMFP. **(C)** Ensayo de dimerización *in vitro* de los mutantes C205S, C250S y C329S. Electroforesis en condiciones no reductoras de proteína purificada, seguida de inmunodetección por *western blot* con anticuerpos anti-laforina.

Dado que la forma de laforina C329S no presentaba dímeros, decidimos estudiar con más detalle este mutante.

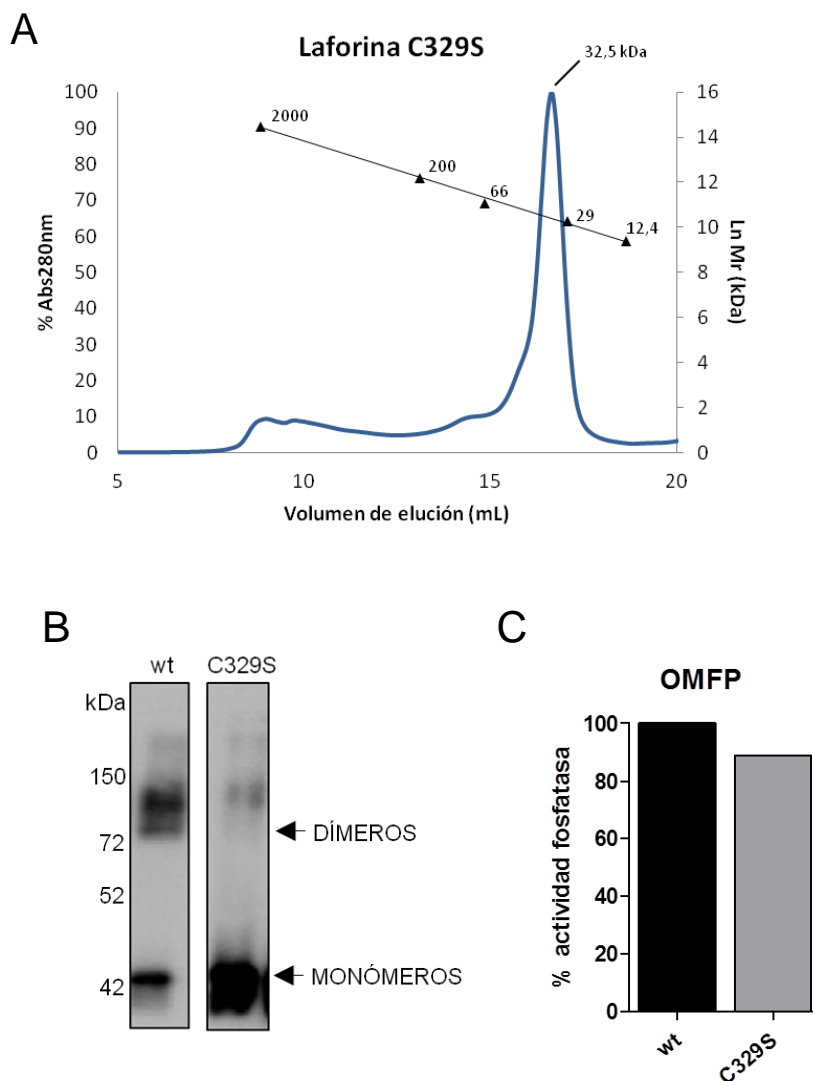
## 5. Caracterización del mutante C329S

### 5.1 Análisis de dimerización mediante cromatografía de exclusión molecular

Los resultados obtenidos en los ensayos de dimerización *in vitro* realizados a partir de cultivos bacterianos sugerían que la cisteína 329 estaba implicada en la formación de dímeros de laforina. Por ello decidimos estudiar la forma mutante C329S por cromatografía de exclusión molecular.

Muestras de proteína purificadas con resina de amilosa se analizaron por este método. Como se muestra en la Figura 9A, el mutante C329S eluye en forma de un único pico con un volumen de eluido equivalente a 32,5 kDa. Para confirmar que se trataba de la forma monomérica de laforina se realizó una electroforesis en condiciones no reductoras seguida de inmunodetección con anticuerpos anti-laforina (Figura 9B). Comparando con una muestra de tipo silvestre purificada también por cromatografía de exclusión molecular se observó que el pico de 32,5 kDa correspondía a laforina monomérica, aunque se apreciaban algunos agregados de alto peso molecular fruto de la manipulación en ausencia de agente reductor.

A partir de estas muestras se realizó un nuevo ensayo fosfatasa *in vitro* sobre OMFP. En el ensayo fosfatasa realizado en el apartado anterior se emplearon muestras de proteína que contenían laforina en distintos estados de agregación. Como se puede observar en la Figura 8C, el mutante C329S presentaba una mayor proporción de agregados que la forma silvestre. Estos agregados suelen ser catalíticamente inactivos, por lo que las diferencias de actividad fosfatasa observadas previamente entre el tipo silvestre y el mutante C329S podían deberse a una distinta cantidad de proteína activa. El nuevo ensayo fosfatasa, obtenida tras la cromatografía de exclusión molecular, mostró que la forma mutante C329S era casi tan activa como el tipo silvestre (Figura 9C).



**Figura 9. Análisis del mutante C329S por cromatografía de exclusión molecular. (A)** Cromatograma de laforina C329S. Se observa un único pico, correspondiente a la fracción monomérica. **(B)** Electroforesis en condiciones no reductoras de proteína purificada, seguida de inmunodetección por *western blot* con anticuerpos anti-laforina. **(C)** Ensayo de la actividad fosfatasa *in vitro* empleando el sustrato artificial OMFP.

## 5.2 Expresión en células de mamífero

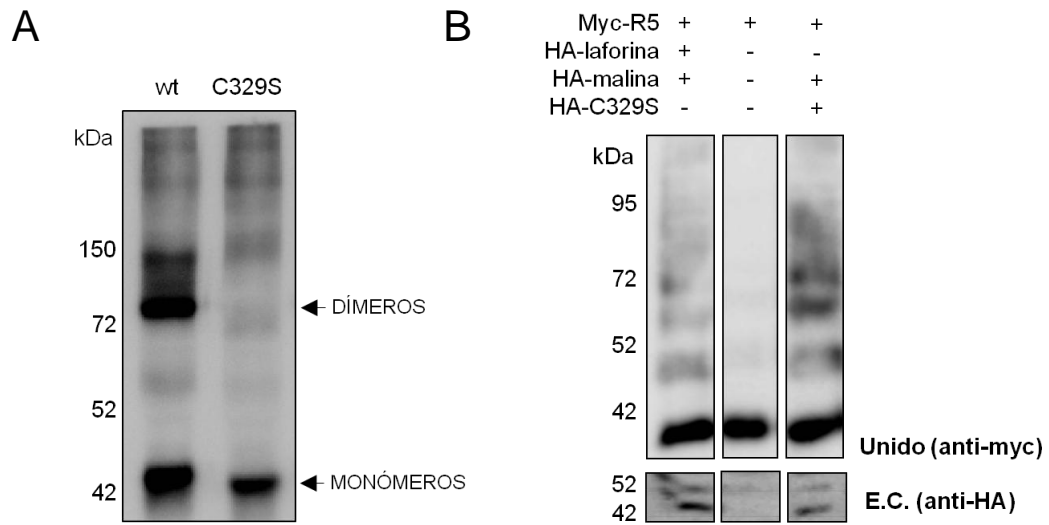
Puesto que los resultados de la cromatografía de exclusión molecular confirmaban lo observado previamente, decidimos pasar a estudiar el efecto de la mutación de este aminoácido en formas de laforina expresadas en células de mamífero. Para ello se realizó una construcción de laforina C329S con la etiqueta myc y se ensayó su capacidad de dimerización *in vitro* utilizando extractos totales de proteína obtenidos a partir de células HEK-293 transfectadas con esta construcción (Figura 10A). Al igual que en las muestras obtenidas a partir de bacterias, el mutante C329S solo aparece en forma monomérica, mientras el tipo silvestre aparece en forma monomérica y dimérica.

Este nuevo resultado apoyaba la participación de la cisteína 329 en la formación de dímeros de laforina. Además, la ausencia completa de dímeros al mutar esta cisteína podría indicar que no hay otras cisteínas participando en la dimerización. Esto, combinado con los resultados obtenidos en los otros mutantes, apunta a la cisteína 329 como única responsable de la dimerización de laforina.

A continuación decidimos comprobar cómo afectaba la incapacidad para dimerizar de este mutante en otras funciones de laforina. Varios grupos han descrito que laforina y malina forman un complejo funcional capaz de ubiquitinar y marcar para degradación a distintos sustratos proteicos, como R5/PTG, una proteína reguladora de la síntesis de glucógeno (Vilchez *et al.*, 2007). A pesar de que trabajos previos en nuestro laboratorio indicaban que la dimerización no influía en la capacidad de interacción con malina (Dukhande *et al.*, 2011), quisimos comprobar si este mutante incapaz de dimerizar podía formar un complejo funcional con malina.

Para ello se cotransfectaron células HEK-293 con construcciones de laforina (C329S), laforina (wt), malina, 6xHis-UB y R5/PTG, para purificar las proteínas ubiquitinadas y ver si la forma mutante de laforina afectaba a la capacidad de malina de ubiquitinar a su sustrato. La proteína purificada empleando una resina de cobalto (ver material y métodos) se analizó por *western blot* empleando anticuerpos anti-myc para detectar la presencia de formas ubiquitinadas de R5/PTG y anti-HA para comprobar que tanto ambas formas de laforina como malina se habían expresado correctamente (Figura 10B). La capacidad de ubiquitinación del complejo laforina (C329S) - malina fue

idéntica a la de la laforina silvestre con malina, lo cual parece indicar que la mutación de dicho aminoácido no afecta a la interacción de laforina con malina.



**Figura 10. Estudio funcional del mutante C329S en células de mamífero. (A)** Ensayo de dimerización *in vitro* del mutante C329S expresado en células de mamífero. Lisados totales de células HEK-293 transfectadas con plásmido myc-laforina (wt, tipo silvestre) o myc-C329S se analizaron por *western blot*. La electroforesis se realizó en condiciones no reductoras y para el revelado se emplearon anticuerpos anti-laforina. **(B)** Ensayo de ubiquitinación de la proteína reguladora de la síntesis de glucógeno R5/PTG por laforina-malina. Sobreexpresión en células HEK-293 de 6xHis-UB, pCMV-HA-malina, pCMV-myc-R5/PTG y pCMV-HA-laforina (tipo silvestre o C329S). Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y las proteínas ubiquitinadas purificadas por cromatografía de afinidad empleando una resina de cobalto, como se describe en material y métodos. El resultado de la purificación se analizó por *western blot* con anticuerpos anti-myc. Unido: proteínas retenidas en la resina de cobalto; E.C: extracto crudo.

Tras el análisis individual de todas las cisteínas de laforina (Tabla IV), solo la C329 impide totalmente la dimerización al mutarse a serina. No obstante, no se puede descartar la participación de alguna otra, como la C278, cuyo mutante no pudimos expresar.

Observamos que todas las formas mutantes presentan menor actividad fosfatasa que el tipo silvestre, independientemente de si la mutación se realiza en el dominio catalítico DSP o no. A este respecto, podríamos utilizar alteraciones en las funciones de laforina (unión a carbohidratos, actividad fosfatasa, interacción con malina) como indicador del nivel de alteración de la estructura global de la proteína. Otro indicador de la estabilidad estructural podría ser la cantidad de agregados formados en condiciones no reductoras.



Las menores reducciones de actividad las encontramos al mutar aminoácidos en el dominio CBD, mientras que en el DSP la variación de actividad es mucho más heterogénea. Sin embargo, resulta de especial interés que el mutante C329S, el único que presenta una ausencia total de dímeros, sea el que mejor conserve la actividad fosfatasa, aunque presente una elevada tendencia a formar agregados.

El análisis por exclusión molecular confirmó la ausencia de dímeros, y mostró que si se aísla la fracción correspondiente a la forma monomérica del mutante C329S, su actividad fosfatasa es prácticamente idéntica a la del tipo silvestre. Así, las diferencias observadas en primer lugar pueden achacarse a una mayor cantidad de agregados inactivos en la proteína mutada.

El hecho de tener una forma mutante incapaz de dimerizar, pero que conserva la actividad fosfatasa, la capacidad de unión a carbohidratos y la interacción con otras proteínas permitirá inferir qué propiedades de laforina se deben exclusivamente a la dimerización. Para ello se planea utilizar ensayos de doble híbrido en levadura para confirmar la ausencia de dimerización de la forma mutante y comprobar cómo afecta esta mutación a la interacción con otras proteínas, como malina o R5/PTG. Por otro lado, mediante fusión a proteínas fluorescentes, podremos estudiar la influencia de la dimerización en la localización subcelular. Otro aspecto de interés sería conocer la relevancia de la oligomerización de laforina en condiciones redox determinadas, dado el papel clave que juega el estrés oxidativo en el desarrollo de las patologías neurodegenerativas. Con estos nuevos estudios esperamos encontrar un papel fisiológico para las diferentes formas de oligomerización de laforina, un proceso que hasta ahora ha permanecido inexplicado.

Mutante	Expresión	Unión a carbohidratos	Actividad fosfatasa	Dimerización
C109/110S	+	+	75%	+
C123S	+	+	80%	+
C169S	+	+	80%	+
C205S	+	+	15%	+
C250S	+	+	0%	+
C266S	+	+	0%	+
C278S	-	¿?	¿?	¿?
C329S	+	+	90%	Nula

**Tabla IV: Resumen del análisis por mutagénesis.** Conjunto de todas las formas mutantes de laforina y su caracterización. La actividad fosfatasa se muestra en porcentaje, tomando como 100% la del tipo silvestre.



## **CONCLUSIONES**



**I.-** Ninguna de las cisteínas del dominio CBD de laforina parecen estar implicadas en la dimerización, ya que su mutación da lugar a formas catalíticamente activas capaces de dimerizar.

**II.-** De las restantes cisteínas, solo la mutación de la 329 da lugar a una forma que no dimeriza.

**III.-** La forma mutante C329S mantiene la actividad fosfatasa y la capacidad de unión a carbohidratos, indicando que la dimerización no es necesaria para estos procesos.

**IV.-** La forma mutante C329S es capaz de formar un complejo funcional con malina, permitiendo la ubiquitinación de sustratos proteicos.

**V.-** Estos resultados sugieren que la cisteína 329 está implicada específicamente en la dimerización de laforina y por tanto el mutante C329S constituye una herramienta útil para analizar las implicaciones fisiológicas de la oligomerización de laforina.



## **BIBLIOGRAFÍA**





2012. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 40:D71-75.
- Aguado, C., S. Sarkar, V.I. Korolchuk, O. Criado, S. Vernia, P. Boya, P. Sanz, S.R. de Cordoba, E. Knecht, and D.C. Rubinsztein. 2010. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet.* 19:2867-2876.
- Andersen, J.N., O.H. Mortensen, G.H. Peters, P.G. Drake, L.F. Iversen, O.H. Olsen, P.G. Jansen, H.S. Andersen, N.K. Tonks, and N.P. Moller. 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol.* 21:7117-7136.
- Castanheira, P., S. Moreira, M. Gama, and C. Faro. 2010. Escherichia coli expression, refolding and characterization of human laforin. *Protein Expr Purif.* 71:195-199.
- Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci.* 271:1251-1262.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. 2003. Current protocols in Protein Science.
- Chan, E.M., S. Omer, M. Ahmed, L.R. Bridges, C. Bennett, S.W. Scherer, and B.A. Minassian. 2004. Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology.* 63:565-567.
- den Hertog, J., A. Groen, and T. van der Wijk. 2005. Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Arch Biochem Biophys.* 434:11-15.
- Denu, J.M., and K.G. Tanner. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 37:5633-5642.
- Dukhande, V.V., D.M. Rogers, C. Roma-Mateo, J. Donderis, A. Marina, A.O. Taylor, P. Sanz, and M.S. Gentry. 2011. Laforin, a dual specificity phosphatase involved in Lafora disease, is present mainly as monomeric form with full phosphatase activity. *PLoS One.* 6:e24040.
- Fernandez-Sanchez, M.E., O. Criado-Garcia, K.E. Heath, B. Garcia-Fojeda, I. Medrano-Fernandez, P. Gomez-Garre, P. Sanz, J.M. Serratosa, and S. Rodriguez de Cordoba. 2003. Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum Mol Genet.* 12:3161-3171.
- Ganesh, S., K.L. Agarwala, K. Amano, T. Suzuki, A.V. Delgado-Escueta, and K. Yamakawa. 2001. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem Biophys Res Commun.* 283:1046-1053.
- Gentry, M.S., J.E. Dixon, and C.A. Worby. 2009. Lafora disease: insights into neurodegeneration from plant metabolism. *Trends Biochem Sci.*
- Gentry, M.S., and R.M. Pace. 2009. Conservation of the glucan phosphatase laforin is linked to rates of molecular evolution and the glucan metabolism of the organism. *BMC Evol Biol.* 9:138.

- Gentry, M.S., C. Roma-Mateo, and P. Sanz. 2012. Laforin, a protein with many faces: glucan phosphatase, adapter protein, and others. *Febs J.*
- Gentry, M.S., C.A. Worby, and J.E. Dixon. 2005. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8501-8506.
- Gomez-Abad, C., P. Gomez-Garre, E. Gutierrez-Delicado, S. Saygi, R. Michelucci, C.A. Tassinari, S. Rodriguez de Cordoba, and J.M. Serratos. 2005. Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology.* 64:982-986.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* :95-98.
- Harriman, D.G., J.H. Millar, and A.C. Stevenson. 1955. Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain.* 78:325-349.
- Kaiser, P., and C. Tagwerker. 2005. Is this protein ubiquitinated? *Methods Enzymol.* 399:243-248.
- Knecht, E., C. Aguado, S. Sarkar, V.I. Korolchuk, O. Criado-Garcia, S. Vernia, P. Boya, P. Sanz, S. Rodriguez de Cordoba, and D.C. Rubinsztein. 2010. Impaired autophagy in Lafora disease. *Autophagy.* 6:991-993.
- Lafora, G.R., and B.Z. Glueck. 1911. Beitrag zur histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Ges Neurol Psychiat.* 6:1-14.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947-2948.
- Liu, Y., Y. Wang, C. Wu, and P. Zheng. 2006. Dimerization of Laforin is required for its optimal phosphatase activity, regulation of GSK3beta phosphorylation, and Wnt signaling. *J Biol Chem.* 281:34768-34774.
- Mittal, S., D. Dubey, K. Yamakawa, and S. Ganesh. 2007. Lafora disease proteins malin and laforin are recruited to aggresomes in response to proteasomal impairment. *Hum Mol Genet.* 16:753-762.
- Roma-Mateo, C., D. Moreno, S. Vernia, T. Rubio, T.M. Bridges, M.S. Gentry, and P. Sanz. 2011a. Lafora disease E3-ubiquitin ligase malin is related to TRIM32 at both the phylogenetic and functional level. *BMC Evol Biol.* 11:225.
- Roma-Mateo, C., C. Solaz-Fuster Mdel, J.V. Gimeno-Alcaniz, V.V. Dukhande, J. Donderis, C.A. Worby, A. Marina, O. Criado, A. Koller, S. Rodriguez De Cordoba, M.S. Gentry, and P. Sanz. 2011b. Laforin, a dual-specificity phosphatase involved in Lafora disease, is phosphorylated at Ser25 by AMP-activated protein kinase. *Biochem J.* 439:265-275.
- Ross, S.H., Y. Lindsay, S.T. Safrany, O. Lorenzo, F. Villa, R. Toth, M.J. Clague, C.P. Downes, and N.R. Leslie. 2007. Differential redox regulation within the PTP superfamily. *Cell Signal.*

- Serratos, J.M., P. Gomez-Garre, M.E. Gallardo, B. Anta, D.B. de Bernabe, D. Lindhout, P.B. Augustijn, C.A. Tassinari, R.M. Malafosse, M. Topcu, D. Grid, C. Dravet, S.F. Berkovic, and S.R. de Cordoba. 1999. A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet.* 8:345-352.
- Singh, S., and S. Ganesh. 2009. Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum Mutat.* 30:715-723.
- Solaz-Fuster, M.C., J.V. Gimeno-Alcaniz, S. Ros, M.E. Fernandez-Sanchez, B. Garcia-Fojeda, O. Criado Garcia, D. Vilchez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, M. Sanchez-Piris, C. Aguado, E. Knecht, J. Serratos, J.J. Guinovart, P. Sanz, and S. Rodriguez de Cordoba. 2008. Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet.* 17:667-678.
- Tagliabracci, V.S., J. Turnbull, W. Wang, J.M. Girard, X. Zhao, A.V. Skurat, A.V. Delgado-Escueta, B.A. Minassian, A.A. Depaoli-Roach, and P.J. Roach. 2007. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19262-19266.
- Van heycop Ten ham, M.W. 1974. Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy. in the epilepsies. *Handbook of clinical neurology* (ed. B. PJ Vinken, G.W). 15.
- Vernia, S., T. Rubio, M. Heredia, S. Rodriguez de Cordoba, and P. Sanz. 2009. Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One.* 4:e5907.
- Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba, and J.J. Guinovart. 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci.* 10:1407-1413.
- Worby, C.A., M.S. Gentry, and J.E. Dixon. 2006. Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem.* 281:30412-30418.