

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I
PARASITOLOGIA

CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA *LGI*.

VICENTE HERRANZ PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de setembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José Manuel García Verdugo
- Dra. Beatriz Rico Gozalo
- Dr. Adolfo López de Munain Arregui
- Dr. Alino Martínez Marcos
- Dr. Francisco E. Olucha Bordonau

Va ser dirigida per:
Dr. Jordi Pérez-Tur

©Copyright: Servei de Publicacions
Vicente Herranz Pérez

Dipòsit legal: V-3492-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7942-4

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Caracterización de la familia génica *LGI*

Vicente Herranz Pérez

**Memoria del trabajo realizado para optar
al grado de Doctor en Ciencias**

en la

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa en Neurociencias Básicas y Aplicadas

27 de abril de 2010



D. Jordi Pérez Tur, Doctor en Biología e Investigador Científico del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

C E R T I F I C A

que D. **Vicente Herranz Pérez**, licenciado en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Caracterización de la familia génica LGI**” para la obtención del grado de Doctor en Biología.

Para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente certificado en:

Valencia, a 28 de septiembre de 2010

Dr. Jordi Pérez Tur

Para la realización de esta tesis, el autor ha sido beneficiario de una beca de formación en investigación (BEFI), concedida por el Instituto de Salud Carlos III según resolución en el BOE de 17 de noviembre de 2003, y un contrato como personal investigador por parte del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) desde el 1 de julio de 2008 al 31 de diciembre de 2009.

Este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos:

- “Caracterización funcional de Epitempina, el gen responsable de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante”; financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (número de referencia SAF2002-00060).
- “Papel de LGI1 y sus parálogos en el desarrollo y proliferación neural”; financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (número de referencia SAF2005-00136).
- “Análisis genético y funcional de enfermedades del sistema nervioso central en humanos”; financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (número de referencia SAF 2006-00724).

«La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a
dudar y a ser ignorante».

Miguel de Unamuno

Agradecimientos

Hay mucha gente a la que me gustaría agradecer la ayuda y apoyo recibidos durante todo este tiempo, y sinceramente, cuando uno se pone a escribir este tipo de cosas, nunca sabe por donde comenzar y tiene que decir mucho, con poco. Pero llegado el momento de la verdad, empezaré por mi director de tesis Jordi, ya que si no fuera por él, todo esto no podría ni haber visto la luz. Ni qué decir tiene que sin mis compañeros de laboratorio, esto tampoco hubiera llegado a buen puerto; cuando empecé en el laboratorio me acompañaba la incertidumbre del que empieza algo desde cero, y pronto sentí que no estaba solo en ello. Poco a poco, algunos fueron abandonando el nido y otros llegaron en su lugar, todos con el mismo sentido del compañerismo y de la amistad. Simplemente diré “gracias” a todos ellos por llevarme tan de la mano hasta este momento, tirando del carro en esos momentos duros que a veces implica una tesis.

Gracias también a todo el personal del Instituto de Biomedicina de Valencia; a mis compañeros de laboratorio durante mi estancia en Canadá. Y quisiera también agradecer a todos aquellos que desde fuera de la ciencia, deben sentirse tan autores de esta tesis como yo mismo: a mis amigos por ser como una segunda familia y haberme hecho reír en todo momento. A mis hermanos, por estar siempre unidos aun cuando no estemos juntos, por hacerme sentir tan orgulloso. A Lidia, por subirse en este tren conmigo aun sin saber a dónde va. Y a mis padres, por enseñarme a ver que en aquello que no sabía si me gustaba o no, quizás había algo; por enseñarme a ver qué es lo primero.

Índice general

Índice general	XI
Índice de figuras	XV
Índice de tablas	XVII
Abreviaturas	XIX
Introducción	3
1.1 Epilepsia.	3
1.1.1 Historia y definición de la epilepsia.	3
1.1.2 Clasificación de las epilepsias.	5
1.1.3 Fisiopatología de la epilepsia.	11
1.2 Epilepsia lateral temporal autosómica dominante.	14
1.2.1 Asociación entre <i>LGII</i> y ADLTE.	15
1.2.2 Organización genómica y arquitectura de dominios de <i>LGII</i> .	18
1.3 Descubrimiento de la familia génica LGI.	22
1.3.1 Búsqueda de homologías para <i>LGII</i> y descubrimiento de genes parálogos.	22
1.4 Expresión de la familia LGI.	25
1.4.1 Expresión de la familia <i>LGI</i> a nivel de ARNm.	25
1.4.2 Expresión de la familia LGI a nivel proteico.	31
	XI

1.5 Función de la familia LGI.	34
1.5.1 Función de LGI1.	34
1.5.2 Función de LGI2.	49
1.5.3 Función de LGI3.	50
1.5.4 Función de LGI4.	51
Objetivos	57
Material y métodos	61
3.1 Material biológico.	61
3.1.1 Cepas bacterianas.	61
3.1.2 Líneas celulares de mamífero.	62
3.1.3 Cepas de rata y ratón.	63
3.2 Construcciones.	63
3.2.1 Clonación direccional por subclonación o PCR.	63
3.2.2 Vectores de expresión utilizados.	66
3.2.3 Cebadores utilizados.	67
3.3 Expresión de proteínas en células de mamífero.	69
3.3.1 Métodos de transfección.	69
3.4 Procesado y detección de proteínas en células de mamíferos.	70
3.4.1 Procesado de medios de cultivo.	70
3.4.2 Procesado de lisados celulares.	70
3.4.3 Inmunoprecipitación.	71

3.4.4 Detección de proteínas mediante SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .	73
3.5 Ensayos de unión a la superficie celular (<i>AP binding</i>).	76
3.5.1 Producción de medios condicionados.	76
3.5.2 Ensayos con neuronas granulares de cerebelo (CGN).	78
3.6 Hibridación <i>in situ</i> de cerebro de ratón.	80
3.6.1 Diseño y síntesis de ribosondas.	80
3.6.2 Obtención de polvo de cerebro.	81
3.6.3 Obtención de cortes e hibridación <i>in situ</i> .	82
3.6.4 Análisis de la distribución anatómica de los transcritos de la familia <i>LGI</i> .	83
3.7 Determinación del tipo celular de expresión de un gen.	84
3.7.1 Microinyección de <i>fluorogold</i> en hipocampo de cerebro de ratón.	85
3.7.2 Inmunohistoquímica.	86
Resultados	91
4.1 Expresión de los ARNm de la familia <i>LGI</i> .	91
4.1.1 Expresión de <i>LGI1</i> .	99
4.1.2 Expresión de <i>LGI2</i> .	101
4.1.3 Expresión de <i>LGI3</i> .	109
4.1.4 Expresión de <i>LGI4</i> .	111

4.2 Estudio del efecto de la presencia de repeticiones EPTP en el destino celular de LGI1.	115
4.3 Ensayos de unión de AP-LGI1 soluble a la membrana celular.	117
Discusión	123
5.1 Expresión de la familia génica <i>LGI</i> .	124
5.1.1 Expresión de <i>LGI1</i> .	125
5.1.2 Expresión de <i>LGI2</i> .	127
5.1.3 Expresión de <i>LGI3</i> .	128
5.1.4 Expresión de <i>LGI4</i> .	128
5.2 Efecto del dominio EPTP en el destino de LGI1.	130
5.3 Unión de AP-LGI1 soluble a la superficie celular.	131
5.4 Discusión general.	132
Conclusiones	139
Anexos	143
Anexo 1: Publicaciones.	143
Bibliografía	147

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de transcritos de la región solapante de 3 cM, resultante de los análisis de ligamiento descritos por Ottman <i>et al.</i> y Poza <i>et al.</i> en el la región cromosómica 10q24.	16
Figura 2. Representación del gen <i>LGI1</i> y de la proteína que codifica.	20
Figura 3. Representación de la estructura de dominios de <i>LGI1</i> .	22
Figura 4. <i>Northern blot</i> del gen <i>LGI1</i> mostrando la expresión de su ARNm.	26
Figura 5. Procesamiento alternativo del gen <i>LGI1</i> .	28
Figura 6. Expresión de los ARNm de los genes <i>LGI1-4</i> .	29
Figura 7. <i>Western blot</i> mostrando la expresión y secreción de las proteínas <i>LGI1-4</i> .	33
Figura 8. Representación esquemática del efecto de la expresión de <i>LGI1</i> sobre la ruta ERK1/2.	41
Figura 9. Representación de los dos complejos implicados en la inhibición de la regeneración del SNC mediada por mielina.	44
Figura 10. Representación esquemática del efecto de la mutación <i>clp</i> sobre <i>LGI4</i> .	53

Figura 11: Diagramas mostrando la distribución e intensidad relativa del marcaje por hibridación <i>in situ</i> de los genes <i>LGI1-4</i> .	98
Figura 12. Fotomicrografías mostrando la expresión del gen <i>LGI1</i> en varias regiones del cerebro de ratón.	100
Figura 13. Distribución de los transcritos del gen <i>LGI2</i> .	103
Figura 14. Fotomicrografías mostrando detalles de la expresión del ARNm de <i>LGI2</i> .	105
Figura 15. Fotomicrografías mostrando doble marcaje para <i>LGI2</i> (púrpura) y marcadores de GABA (marrón).	108
Figura 16. Fotomicrografías mostrando la expresión de <i>LGI3</i> .	110
Figura 17. Fotomicrografías mostrando la expresión del ARNm del gen <i>LGI4</i> .	113
Figura 18. Fotomicrografías mostrando algunos detalles de la expresión del ARNm del gen <i>LGI4</i> .	114
Figura 19. Mínimo número de repeticiones EPTP en <i>LGI1</i> para su secreción.	116
Figura 20. Unión de AP- <i>LGI1</i> a células granulares de cerebelo.	119

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las crisis epilépticas según la ILAE.	6
Tabla 2. Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos según la ILAE.	9
Tabla 3. Mutaciones encontradas en la secuencia del gen <i>LGII</i> en pacientes de ADLTE.	17
Tabla 4. Cebadores empleados en la realización de este trabajo.	68
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas de fusión por <i>Western blot</i> en células de mamífero.	75
Tabla 6. Características de las ribosondas utilizadas.	81
Tabla 7. Anticuerpos usados en los ensayos de inmunohistoquímica sobre cortes de cerebro de ratón.	87
Tabla 8. Niveles relativos de expresión de los genes <i>LGII-4</i> en cerebro de ratón.	92

Abreviaturas

- ADLTE** Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante.
aa Aminoácido/s.
ac Comisura anterior.
Acb Núcleo *accumbens*.
aci Comisura anterior, parte intrabulbar.
Aco Núcleo anterior cortical amigdalóideo.
AD Núcleo talámico anterodorsal.
ADNc ADN complementario.
AHA Área anterior hipotalámica.
AOB Bulbo olfatorio accesorio.
AOD Bulbo olfatorio anterior, parte dorsal.
AOE Bulbo olfatorio anterior, parte externa.
AOL Bulbo olfatorio anterior, parte lateral.
AP Fosfatasa alcalina (*Alcaline Phosphatase*).
ARNds Double-stranded ARN.
ARNm ARN mensajero.
BA Amígdala basal.
BCIP 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*).
BLA Amígdala basolateral anterior.
BMA Núcleo amigdalóideo basomedial, parte anterior.
BST Núcleo del lecho de la estría terminal.
CA1 Cuerno de Ammon 1.
CA2 Cuerno de Ammon 2.
CA3 Cuerno de Ammon 3.
Ce Cerebelo.
CeA Amígdala central.
CGN Cerebelar granular neurons.
CIC Núcleo central del colículo inferior.
cM CentiMorgans.
CM Núcleo talámico centromedial.
Cpu *Caudatus putamen*.
DC Núcleo coclear dorsal.
DCIC Corteza dorsal del colículo inferior.
DD Núcleo dorsal profundo.
DeCe Núcleo dentado cerebelar.
DeN Núcleo dentado.
Dend Corteza endopiriforme dorsal.
DG Giro dentado.
DGSC Capa gris profunda del colículo superior.
Dk Núcleo de Darkschewitsch.
DO Densidad óptica
DpMe Núcleo mesencefálico profundo.
DR Núcleo del rafe dorsal.
DRG Neuronas de glanglios basales de la raíz dorsal.
Dsub Subículo dorsal.
ec Cápsula externa.
EEG Electroencefalograma.
Ent Corteza entorrinal.
EPL Capa plexiforme externa del bulbo olfatorio.

f Fónix.
FC *Fasciola cinereum*.
Gl Capa glomerular del bulbo olfatorio.
GrL Capa granular cerebelar.
GrO Capa granular del bulbo olfatorio.
h Horas.
Hb Habénula.
HRP Horse Radish Peroxidase.
ic Cápsula interna.
icp Pedúnculo inferior cerebelar.
IF Núcleo interfascicular.
IGSC Capa gris interna del colículo superior.
ILAE International league against epilepsy.
IO Oliva inferior.
IP Núcleo interpeduncular.
lpl Capa plexiforme interna del bulbo olfatorio.
kb Kilobases.
kDa Kilodalton.
La Amígdala lateral.
LD Núcleo talámico laterodorsal.
LG Núcleos geniculados laterales.
LH Área lateral hipotalámica.
IHb Habénula lateral.
LL Lemnisco lateral.
LM Núcleo mamilar lateral.
LP Núcleo talámico lateroposterior.
LPO Área preóptica lateral.
LSd Núcleo septal lateral, parte dorsal.
LSi Núcleo septal lateral, parte intermedia.
LVe Núcleo vestibular lateral, parte dorsal.
MdR Núcleo reticular medular.
MeA Amígdala medial.
mfb Tracto medial.
MG Cuerpo geniculado medial.
MGd División dorsal del cuerpo geniculado medial.
MGv División ventral del cuerpo geniculado medial.
mHb Habénula medial.
Mi Capa mitral del bulbo olfatorio.
min Minutos.
ML División lateral del núcleo mamilar medial.
MM División medial del núcleo mamilar medial.
MMn División mediana del núcleo mamilar medial.
MnR Núcleo mediano del rafe.
MOB Bulbo olfatorio principal.
MoV Núcleo motor del nervio trigémino.
MPO Área preóptica medial.
MS Núcleo del *septum* medial.
MS/LS Área de transición entre *septum* medial y lateral.
mta Tracto mamilotalámico.
mtg Tracto mamilotegmental.
NBT Azul de nitrotetrazolio (*nitro blue tetrazolium*).
NTS Núcleo del tracto solitario.
ORF Open reading frame.
Pa Núcleo pálido.
PAG Materia gris periacueductal.
PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide gel electroforesis*).

PaV Núcleo paraventricular hipotalámico.
pb Pares de base.
PBS Phosphate Buffer Saline
PCR Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).
pcvLGN División parvocelular del núcleo geniculado lateral.
PFA Paraformaldehído.
PIN Corteza posterior intralaminar.
Pir Corteza piriforme.
Pn Núcleos pontinos.
pNPP P-nitrofenil fosfato.
PrV Núcleo principal del nervio trigémino.
PSA Persulfato amónico.
PTA Área pretectal.
PTZ Pentilenotetrazol.
Pu *Putamen*.
PVP Núcleo paraventricular talámico, división posterior.
pyx Decusación piramidal.
Re Núcleo *reuniens* del tálamo.
RF Formación reticular.
Rli Núcleo lineal rostral del rafe.
RN Núcleo rojo.
RPC Núcleo rojo, parte parvocelular.
rpm Revoluciones por minuto.
RPO *Reticularis pontis oralis*.
Rt Núcleo reticular talámico.
s Segundos.
SB Tampón de carga (*Sample buffer*).
SC Colículo superior.
SDS Dodecil sulfato sódico.
SI Sustancia *innominata*.
sm Estría medular.
SNC Sistema nervioso central.
SNC *Substantia nigra, pars compacta*.
SNP Sistema nervioso peritérico
SNr *Substantia nigra, pars reticulata*.
SpV Tracto espinal trigeminal.
st Estría terminal.
SuM Núcleo supramamilar.
T^a Temperatura ambiente.
TEMED N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina.
TS Núcleo triangular septal.
TT *Taenia tecta*.
UTR Untranslated region.
VCA Núcleo coclear ventral, parte anterior.
VCP Núcleo coclear ventral, parte posterior.
vDB Núcleo de la parte vertical de la banda diagonal.
VL Núcleo ventrolateral talámico.
VP Pálido ventral.
VPL Núcleo talámico ventral posterolateral.
VPo Núcleo ventral posterior talámico.
VTA Área ventral tegmental.
ZI Zona *incerta*.

Introducción

Capítulo 1

Introducción

1.1 Epilepsia.

1.1.1 Historia y definición de la epilepsia.

La palabra epilepsia tiene su origen etimológico en el término griego *epilambaneim*, cuyo significado es “ser atacado o agarrado”. Los griegos consideraban la epilepsia una enfermedad divina o sagrada, ya que “sólo Dios podía poseer una persona, sacudirla, hacerla caer, dejarla como muerta y después revivirla”.

No obstante, se tiene constancia de conceptos que giraban en torno a la epilepsia ya en los textos ayurvédicos de Charaka Samhita, en la antigua medicina india, donde la epilepsia es descrita como una pérdida de la consciencia. Asimismo, existen tablas babilónicas de 2000 a. C. que describen los síntomas típicos de esta afección como enfermedad *bennu*, que en contraste con la medicina ayurvédica, apuntan a un origen sobrenatural de la enfermedad. Esta idea fue la precursora de la posterior concepción griega de “enfermedad sagrada” y de que hasta prácticamente el S. XVIII y XIX, no fueron más que unos cuantos los que como Hipócrates (460-375 a. C.) y Galeno (129-200 a. C.) relacionaron el origen de la epilepsia con una afección del cerebro. Durante todo ese tiempo, la epilepsia fue asociada a maleficios, posesiones y una visión sobrenatural de la enfermedad. Tanto es así que, a lo largo de este periodo de tiempo, la gente que padecía epilepsia fue incluso perseguida y castigada al

ser considerada un estigma social. Pese a ello, existen casos a lo largo de la historia de pacientes de epilepsia que lograron llegar al éxito y la celebridad, como es el caso de Julio César, Fiódor Dostoyevsky o el poeta Lord Byron (OMS, 2001a).

Ya en el S. XIX, con el desarrollo de la neurología como una rama independiente de la psiquiatría, el concepto de epilepsia como un problema cerebral se aceptó mucho más ampliamente, sobre todo en Europa y Norteamérica. A finales de ese siglo se empezó a utilizar el bromuro potásico como el primer antiepiléptico efectivo, aunque posteriormente, con la aceleración del descubrimiento de nuevos fármacos, fue pronto sustituido por otros medicamentos más efectivos que han hecho que, poco a poco, los enfermos de epilepsia gocen de una calidad de vida cada vez mayor: en 1912 se empleó por primera vez el fenobarbital como anticonvulsivo y más tarde, en 1937, Houston Merritt y Tracey Putnam descubrieron la fenitoína (Westbrook, 2001).

A día de hoy 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, 2001b).

No todas las personas que padecen una crisis epiléptica se diagnostican de epilepsia. Por ello, es importante diferenciar el concepto de epilepsia del de crisis epiléptica: una **crisis epiléptica** es el resultado de una descarga neuronal cortical excesiva, que puede ser focal, generalizada o secundariamente generalizada (ver apartado 1.1.2), y que es seguida de manifestaciones clínicas, produciendo eventualmente un trastorno autolimitado de la consciencia, comportamiento, emoción o cualquier función cortical, dependiendo de la localización y características de las descargas. Así

pues, se habla de epilepsia cuando una persona padece crisis epilépticas repentinas y episódicas. De modo que se pueden sufrir crisis epilépticas sin padecer epilepsia (OMS, 2001b).

Desde el punto de vista epidemiológico, la epilepsia es una de las enfermedades crónicas más frecuentes, con una incidencia a nivel mundial de entre 24 y 53 casos por cada 100 000 habitantes y una prevalencia de aproximadamente el 0,5% (Forsgren et al., 2005). 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 los fármacos utilizados (Pato-Pato et al., 2004). Sin embargo, a pesar del relativo éxito de los tratamientos, todas las terapias de las que se dispone hoy en día son sintomáticas, es decir, las personas afectadas de epilepsia pueden tomar fármacos que evitan la aparición de las crisis, pero no curan la enfermedad. En la actualidad no existe modo conocido de abolir el problema por completo, ni tampoco de prevenir su aparición, ni siquiera en individuos con alto riesgo conocido de desarrollar estas crisis (Lees et al., 2000).

1.1.2 Clasificación de las epilepsias.

Las epilepsias son un grupo muy extenso y heterogéneo de enfermedades que resulta muy difícil de clasificar. Para diagnosticar correctamente una epilepsia se ha de tener en cuenta el tipo de crisis, la edad de aparición, la etiología, la severidad y recurrencia, el horario de aparición, los factores desencadenantes, los patrones de electroencefalograma (EEG), los resultados de neuroimagen, la respuesta al tratamiento y el pronóstico (Salas-Puig and Gil-Nagel, 2004). Por tanto, una clasificación de los síndromes epilépticos

requiere de la existencia de una clasificación de las crisis en la que basarse.

Clasificación de las crisis epilépticas.

Las crisis epilépticas se pueden clasificar desde el punto de vista clínico en dos grupos: parciales y generalizadas. Esta clasificación ha evolucionado bajo el impulso de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) hasta dar lugar a la clasificación aceptada en 1989. Esta clasificación, representada en la tabla 1, se basa en la semiología clínica de las crisis y en las características del electroencefalograma durante la crisis e intercrítico. Esta clasificación se basa en la distinción entre crisis generalizadas y parciales.

▣ **Tabla 1.** Clasificación de las crisis epilépticas según la ILAE.

Crisis epilépticas
I. Crisis parciales (focales)
Crisis parciales simples (con síntomas motores, sensitivos, autónomos o psicológicos).
Crisis parciales complejas.
Crisis parciales complejas con evolución a crisis secundariamente generalizadas.
II. Crisis generalizadas (convulsivas o no convulsivas)
Ausencias.
- Típicas (<i>petit mal</i>).
- Atípicas.
Mioclónicas.
Clónicas.
Tónicas.
Tonicoclónicas.
Atónicas.

Las **crisis parciales o focales** se originan en un pequeño número de neuronas que constituyen un foco epiléptico. Las crisis parciales pueden ser *parciales simples* (sin alteración de la consciencia) o *parciales complejas* (con alteración de la consciencia). Si una crisis parcial progresa en el tiempo, puede dar lugar a una pérdida de la consciencia, dando lugar a caídas, a que el paciente extendiéndola rígidamente las extremidades (*fase tónica*) y después tenga sacudidas de todas las extremidades (*fase clónica*). Estos síntomas se clasifican como crisis tonicoclónica secundariamente generalizada (antes llamada de *grand mal*).

Los síntomas que preceden al inicio de una crisis parcial se denominan *auras*. Las auras comprenden frecuentemente sensaciones anormales como temor, una sensación ascendente en el abdomen, o incluso un determinado olor. El aura se debe a la actividad eléctrica originada en el foco epiléptico y, por tanto, representa la manifestación más temprana de una crisis parcial. El tiempo que transcurre después de una crisis parcial hasta que el paciente recupera una función neurológica normal se denomina *período postcrítico*.

Las **crisis generalizadas** comienzan sin estar precedidas de un aura o crisis focal y afectan desde el principio a ambos hemisferios. Pueden dividirse a su vez en convulsivas y no convulsivas, dependiendo de si la crisis se acompaña o no de movimientos tónicos o clónicos. El prototipo de crisis generalizada no convulsiva es la típica *crisis de ausencia* (antes llamada *petit mal*) que se observa generalmente en niños. Estas crisis comienzan de forma repentina, habitualmente duran menos de diez segundos, van acompañadas del cese de toda actividad motora y provocan pérdida de la consciencia a diferencia de lo que sucede en las crisis parciales, y no hay aura ni período postcrítico. Los pacientes pueden presentar

manifestaciones leves como parpadeo, pero no caen ni manifiestan movimientos tonicoclónicos.

Otras crisis generalizadas pueden consistir solamente en movimientos motores (mioclónicas, clónicas o tónicas). Sin embargo, la crisis generalizada más frecuente es la tonicoclónica o de *grand mal*. Estas crisis convulsivas empiezan también de forma repentina, a menudo con un gruñido o un grito al producirse una espiración forzada por la contracción tónica del diafragma y el tórax. Es durante la fase tónica cuando el paciente puede caer al suelo, rígido y con la mandíbula encajada, perder el control del esfínter urinario o rectal y llegar a estar cianótico. La fase tónica típica dura unos 30 segundos antes de evolucionar a unas sacudidas clónicas de las extremidades que duran uno o dos minutos. Esta fase activa de la crisis generalizada tonicoclónica va seguida de una fase postcrítica durante la cual el paciente está somnoliento y puede quejarse de cefalea y dolor muscular (Westbrook, 2001).

Clasificación de las epilepsias y de los síndromes epilépticos.

La clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos aceptada por la ILAE en 1985 y modificada ligeramente en 1989 (ILAE, 1989) ha supuesto probablemente el avance más importante en el campo de la epileptología, al menos desde el punto de vista clínico. La clasificación actual (1989) está basada en la diferenciación entre síndromes generalizados, síndromes focales o relacionados con una localización, síndromes indeterminados y síndromes especiales. Por otra parte dicha clasificación distingue en cada uno de los grupos los síndromes idiopáticos, sintomáticos y criptogénicos (tabla 2).

Síndromes idiopáticos, son aquellos en los que no existe otra enfermedad que la propia epilepsia y que indica una propensión de

la corteza cerebral a generar crisis epilépticas sin otra causa determinante que no sea una base genética.

Síndromes sintomáticos (epilepsias secundarias), aquellas de etiología conocida; como trauma, tumor, malformaciones cerebrales o enfermedades metabólicas. Existen cientos de enfermedades hereditarias, generalmente muy poco frecuentes, en las que aparecen crisis epilépticas como parte del fenotipo clínico complejo. En la mayoría de los casos son enfermedades degenerativas, o trastornos en la migración neuronal, en las que las crisis aparecen como consecuencia del daño neuronal, y es poco probable que los genes implicados en su aparición tengan importancia en el origen de epilepsias idiopáticas.

Síndromes criptogénicos, conforman las de causa desconocida, aunque se supone una base sintomática debido a pruebas circunstanciales o similitudes con casos en los que se conoce la causa.

▣ **Tabla 2.** Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos según la ILAE.

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.

Epilepsias y síndromes relacionados con la localización (Focal, Parcial)
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.

Epilepsias y síndromes relacionados con la localización (Focal, Parcial)
Convulsiones febriles.
Crisis epiléptica o status epiléptico aislado.
Crisis relacionadas con procesos metabólicos o tóxicos agudos.

1.1.3 Fisiopatología de la epilepsia.

Durante mucho tiempo se ha considerado la epilepsia como una enfermedad no genética, probablemente debido a que las crisis esporádicas o recurrentes características pueden ser causadas por numerosos factores como daño cerebral adquirido (traumatismos, isquemia, tumores), alteraciones del metabolismo o malformaciones congénitas. En estas epilepsias, denominadas *sintomáticas* según la clasificación de la ILAE, puede atribuirse como responsable una causa no genética con relativa facilidad. Sin embargo, alrededor del 1% de la población desarrolla crisis recurrentes sin razón obvia y sin la presencia de anomalías neurológicas (epilepsias idiopáticas y criptogénicas) (Steinlein, 2004).

El carácter hereditario de las epilepsias fue inicialmente sugerido por la observación de la agregación familiar de los pacientes de esta enfermedad, es decir, que con frecuencia los parientes de enfermos de epilepsia se encuentran también afectados por este mal. Esta agregación familiar ha sido explicada tradicionalmente de varios modos. En primer lugar puede ocurrir por azar. Al menos uno de cada 20 individuos tendrá una crisis de tipo epiléptico en algún momento de sus vidas, y esta frecuencia es aplicable también a los familiares de los enfermos de epilepsia (Ottman et al., 1993). En segundo lugar, se ha llegado a pensar que existe una predisposición basal a la epilepsia que sí es heredable, aunque la aparición del síndrome depende de otros factores externos adquiridos pre o postnatalmente (Berkovic and Steinlein, 1999). Por

otra parte, la existencia de familias con varios miembros afectados puede ser consecuencia de la exposición compartida a factores ambientales o a patrones comunes de comportamiento (como la dieta) y no de factores genéticos. El hecho es que el riesgo de padecer epilepsia se incrementa de dos a cuatro veces en los parientes de primer grado de personas con epilepsias idiopáticas o criptogénicas comparando con la población general. No obstante, una proporción importante de personas con epilepsia no tienen familiares afectados.

En cualquier caso, hoy en día la etiología genética en las epilepsias generalizadas es ampliamente aceptada mientras que las epilepsias focales o parciales han seguido atribuyéndose hasta hace relativamente poco a factores ambientales como daños en el nacimiento, infecciones, traumatismo craneal postnatal, o lesiones cerebrales (tumores o daño vascular) (Andermann et al., 2005). De hecho, mientras que la idea de que las epilepsias generalizadas son frecuentemente heredadas es más fácil de aceptar, la herencia de un síndrome focal no lo es tanto, ya que resulta difícil entender cómo un defecto genético que en teoría se está expresando en todo el cerebro de forma simétrica, puede causar una crisis parcial (Berkovic and Steinlein, 1999). Pese a esto, actualmente sabemos que tanto las epilepsias generalizadas como las parciales están determinadas genéticamente y que claramente el riesgo de padecer epilepsia está incrementado en los parientes de los afectados pero, como en el caso de los estudios de gemelos, se ha visto que este riesgo es mayor en el caso de las epilepsias generalizadas que en las parciales (Ottman et al., 1998).

Como en la mayoría de enfermedades, los síndromes epilépticos más comunes tanto generalizados como parciales, se pueden explicar con un modelo de herencia multifactorial o compleja, en el

que varios genes contribuyen cada uno con un pequeño efecto que por sí solo es incapaz de producir el fenotipo. Sin embargo la combinación de estos *genes de susceptibilidad* junto con el efecto de factores ambientales genera el fenotipo epiléptico. Un pequeño porcentaje sin embargo, son monogénicas de modo que mutaciones en un único gen son suficientes para producir el fenotipo patológico (Tan et al., 2004).

Papel de los canales iónicos en la fisiopatología de la epilepsia.

Las epilepsias idiopáticas están en su mayoría causadas por mutaciones en genes que codifican para canales iónicos o sus subunidades. Dado que una crisis epiléptica consiste en una descarga sincronizada de un grupo de neuronas y que la descarga resulta de la despolarización del potencial umbral de membrana, es fácil imaginar que mutaciones en este tipo de canales resultarán en una alteración de la excitabilidad neuronal, lo que puede llevar, en determinadas circunstancias, a una situación de descargas recurrentes y sincronizadas y a una crisis epiléptica. Hay que tener en cuenta sin embargo, que un incremento de la excitabilidad no es sinónimo de crisis, ya que este incremento en la excitabilidad puede darse en neuronas de tipo inhibitorio.

Este mecanismo se ha visto confirmado con el descubrimiento de que numerosos síndromes epilépticos, tanto generalizados como parciales, son causados por mutaciones en genes que codifican para subunidades de estos canales iónicos o proteínas accesorias. En todos los casos, se trata de síndromes con una herencia autosómica dominante o de síndromes esporádicos causados por mutaciones de novo en heterocigosis.

Hasta hace relativamente poco tiempo, todos los síndromes epilépticos para los cuales se había llegado a identificar un defecto

molecular causante correspondían a este grupo de proteínas, con lo que el único mecanismo del que se disponía de evidencias para explicar la patología epiléptica era la alteración de la excitabilidad neuronal por el funcionamiento erróneo de estos canales.

En la actualidad se conocen 15 genes que codifican para estos canales en los que mutaciones causan diferentes síndromes epilépticos. Entre ellos, encontramos genes en canales iónicos excitadores (canales de Na⁺, Ca²⁺ o en el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$) y en canales iónicos inhibidores (canales de K⁺, receptores de GABA, canales de Cl⁻) (Turnbull et al., 2005).

Sin embargo, existen otras vías neurológicas que pueden llevarnos a un estado de hiperexcitabilidad neuronal. De hecho, mutaciones en genes que estén implicados en plasticidad, desarrollo o metabolismo neuronal, son candidatos potenciales a ser causantes de epilepsia. Uno de los primeros genes descritos cuyas mutaciones causan epilepsia y que no codifica para un canal iónico es *LGII* (leucine-rich glioma inactivated 1). Mutaciones en este gen causan epilepsia lateral temporal autosómica dominante (ADLTE) (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002), epilepsia sujeta a estudio en esta tesis doctoral.

1.2 Epilepsia lateral temporal autosómica dominante.

La epilepsia lateral temporal autosómica dominante o epilepsia parcial con síntomas auditivos (ADLTE, OMIM #600512) es una enfermedad neurológica que cursa con crisis parciales simples visuales (imágenes simples) o auditivas (música, 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.

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, quienes, además, mapearon esta enfermedad al brazo largo del cromosoma 10 (Ottman et al., 1995). 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.

1.2.1 Asociación entre *LGII* y *ADLTE*.

El estudio de Ottman y colaboradores se basaba en el análisis de ligamiento en una gran familia de tres generaciones, dentro de las cuales había diez individuos afectados que permanecían vivos. El resultado del ligamiento reveló que los diez pacientes de la familia compartían un haplotipo mínimo común en una región de 10 cM comprendida entre los marcadores D10S185 y D10S192 del cromosoma 10q24.

En 1999, Poza y colaboradores (Poza et al., 1999) acotaron a 15 cM 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 3 cM común donde el posible gen responsable de esta enfermedad podría estar localizado, tal y como puede verse en la figura 1.

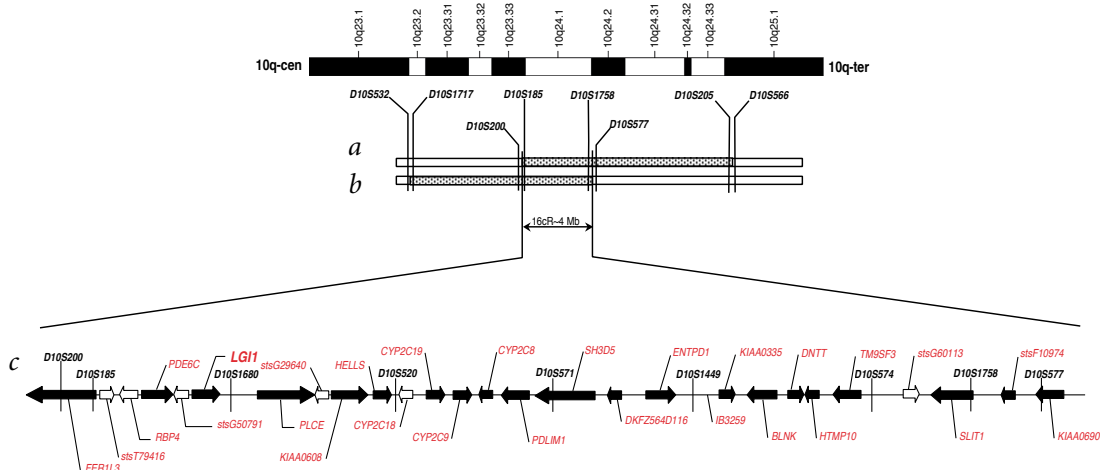


Figura 1. Mapa de transcritos de la región solapante de 3 cM, resultante de los análisis de ligamiento descritos por Ottman *et al.* y Poza *et al.* en la región cromosómica 10q24. Las barras con trama de puntos representan las regiones genéticas mínimas de ligamiento definidas por los trabajos de Ottman (barra a, arriba) y Poza, (barra b, abajo). La región de solapamiento comprende unos 3 cM y está delimitada por los marcadores D10S200 y D10S577, que corresponde a 4 Mb. En en la barra c, se representan los 28 genes localizados en esta región. Extraído de Kalachikov *et al.*, 2002.

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

Simultáneamente, Kalachikov y colaboradores también encontraron cinco 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 *et al.*, 2002). Ninguno de estos

cambios se encontró en población control sana, de manera que se definió *LGII* como el gen cuyas mutaciones eran responsables de la aparición de ADLTE.

Desde entonces y hasta la fecha, se han encontrado un total de 23 mutaciones (tabla 3) en la secuencia de *LGII* en pacientes con epilepsia lateral temporal autosómica dominante. Estas mutaciones se han identificado a lo largo de toda la secuencia del gen y siempre, como cabe esperar en una enfermedad autosómica dominante, en heterocigosis. Aunque las manifestaciones clínicas presentan variaciones entre familias, todas ellas se caracterizan por una predominancia de crisis parciales con componente auditivo. Por otra parte, los distintos tipos de mutaciones encontrados en la secuencia codificante del gen (cambio de aminoácido, codones de parada prematuros,...), no dan lugar a variaciones fenotípicas significativas en los individuos que las padecen, a pesar de que algunas de estas mutaciones provocan la aparición de codones de parada muy prematuros (Hedera et al., 2004; Kalachikov et al., 2002). Las mutaciones descubiertas hasta la fecha afectan a distintos dominios de la proteína codificada por el gen *LGII*.

▣ **Tabla 3.** Mutaciones encontradas en la secuencia del gen *LGII* en pacientes de ADLTE.

Mutación	Exón	Efecto
c.124 T→C	1	Mutación puntual p.C42R (Ottman et al., 2004).
c.124 T→G	1	Mutación puntual p.C42G (Berkovic et al., 2004).
c.136 T→C	1	Mutación puntual p.C46R (Gu et al., 2002a; Pizzuti et al., 2003).
c.329 delC	3	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada al final del exón 3 (Hedera et al., 2004).
c.329 C→A	3	Mutación puntual p.A110D (Ottman et al., 2004).
c.360-3 C→A	3-4	Retención intrón, proteína truncada (Kalachikov et al., 2002).
c.365 T→A	4	Mutación puntual p.I122K (Striano et al., 2008).

Mutación	Exón	Efecto
c.367 G→A	4	Mutación puntual p.E123K (Bonaventura et al., 2009).
c.431+1 G→A	4-5	Mutación en sitio dador del exón 5 que resulta en el procesado erróneo de los exones 3 y 4 (Chabrol et al., 2007).
c.435 C→G	5	Mutación puntual p.S145R (Hedera et al., 2004).
c.461 T→C	5	Mutación puntual p.L154P (Pisano et al., 2005).
c.598 T→C	6	Mutación puntual p.C200R (Michelucci et al., 2003).
c.611delC	6	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov et al., 2002).
c.758 delC	7	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Morante-Redolat et al., 2002).
c.839-2 A→C	7-8	Retención intrón, proteína truncada (Kobayashi et al., 2003).
c.893 T→C	8	Mutación puntual p.I298T (Ottman et al., 2004).
c.953 T→G	8	Mutación puntual p.F318C (Fertig et al., 2003).
c.1050-1051 del-CA	8	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov et al., 2002).
c.1148 A→C	8	Mutación puntual p.E383A (Kalachikov et al., 2002).
c.1295 T→A	8	Mutación puntual p.V432R (Michelucci et al., 2003).
c.1418 C→T	8	Mutación puntual p.S473L (Wallace et al., 1998).
c.1420 C→T	8	Codón de parada prematuro Stop (Morante-Redolat et al., 2002).
c.1639 insA	8	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov et al., 2002).
c.1642 C→T	8	Mutación puntual p.S473L (Fujita et al., 2009).

1.2.2 Organización genómica y arquitectura de dominios de *LGII*.

Mediante estudios a nivel genómico y bioinformático, el grupo de Cowell (Chernova et al., 1998; Somerville et al., 2000) describió que *LGII* se encuentra situado a nivel genómico en una región de aproximadamente 25 Kb, estando codificado por ocho exones de tamaños entre 72 pb y 1197 pb (figura 2A). El RNAm contiene una

pauta abierta de lectura (ORF) de 1674 pb que comienza con un codón de inicio ATG en posición 225 desde el comienzo del exón 1 y codifica para una proteína de 557 aminoácidos.

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). Aún así, se delimitó una región mínima de 597 pb capaz de dirigir la expresión del gen de la luciferasa en un estudio *in vitro* (Somerville et al., 2000).

Mediante herramientas informáticas de predicción establecieron que la proteína LGI1 posee una región hidrofóbica al comienzo de su secuencia (aminoácidos 1-34) que actuaría como péptido señal siendo eliminado por corte proteolítico 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 288 a 309) codificada en 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 2B). Las LRRs encontradas en LGI1, tres repeticiones y media según Chernova (Chernova et al., 1998), y cuatro y media según Somerville (Somerville et al., 2000), presentan una fenilalanina conservada en posición 20 dentro de la repetición, lo que las sitúa 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 and Gay, 1996).

En la región C-terminal, teóricamente intracelular, no lograron encontrar homología con ningún dominio conocido. En cambio, sí se encontraron en la secuencia de LGI1, dos sitios potenciales de N-glicosilación (Asn192 y Asn277) en el dominio N-terminal, así como una serina (Ser313) y una tirosina (Tyr384) potencialmente fosforilables por acción de la protein quinasa dependiente de cAMP o tirosin quinasa. Además, encontraron varias dianas de fosforilación para la Protein Quinasa C (PKC) y la Casein Quinasa II.

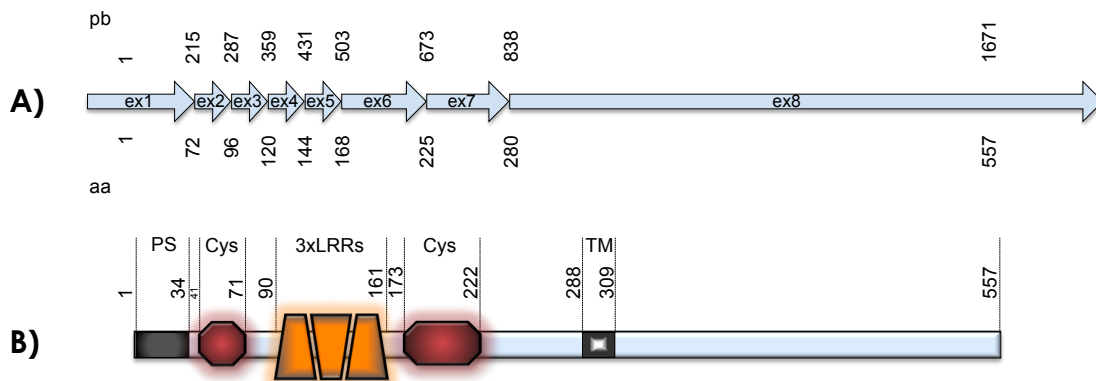


Figura 2. Representación del gen *LGI1* y de la proteína que codifica. A) Distribución exónica del gen *LGI1*. B) Distribución de motivos estructurales a lo largo de la secuencia proteica de *LGI1* según Chernova *et al.*, (Chernova *et al.*, 1998). Pueden apreciarse el péptido señal (PS) y los dominios ricos en cisteína (CYS), flanqueando a los dominios ricos en leucina (LRRs).

Rastreando una genoteca de cDNA de ratón con una sonda del gen *LGI1* humano lograron identificar un gen con un 91% de identidad a nivel de nucleótido y 97% a nivel de secuencia proteica (Chernova *et al.*, 1998). Este ortólogo de *LGI1* (GeneBank: AF246818) también está codificado por ocho exones estando las uniones entre ellos muy conservadas entre ambas especies.

Posteriormente, los estudios *in silico* llevados a cabo mediante el programa SMART por Morante-Redolat y colaboradores (Morante-Redolat et al., 2002), 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 et al., 1998) se encontraría situado justo en la primera repetición de este nuevo dominio (Morante-Redolat et al., 2002), (figura 3A). Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Scheel y colaboradores (Scheel et al., 2002), se encontró más tarde 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. Un análisis más exhaustivo mediante el programa de predicción HMM, definió este nuevo dominio como seis 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 se hizo 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 representación según este análisis queda plasmada en la figura 3B. Además, dichas repeticiones también se encontraron en la secuencia de la proteína KIAA1916 (nº acceso en GenBank, AB067503), proteína que había sido propuesta como parálogo de LGI1 por Morante-Redolat y colaboradores (Morante-Redolat et al., 2002). En ambas proteínas, este dominio aparecía localizado en el extremo C-terminal, mientras que en el extremo N-terminal ambas proteínas presentaban tres regiones ricas en leucina flanqueadas en ambos extremos por regiones ricas en cisteína. La tercera proteína encontrada, resultó ser una entrada anónima a la base de datos (nº

acceso en GenBank, BC021197) caracterizada por un dominio N-terminal de tipo Trombospondin (TSP-N).

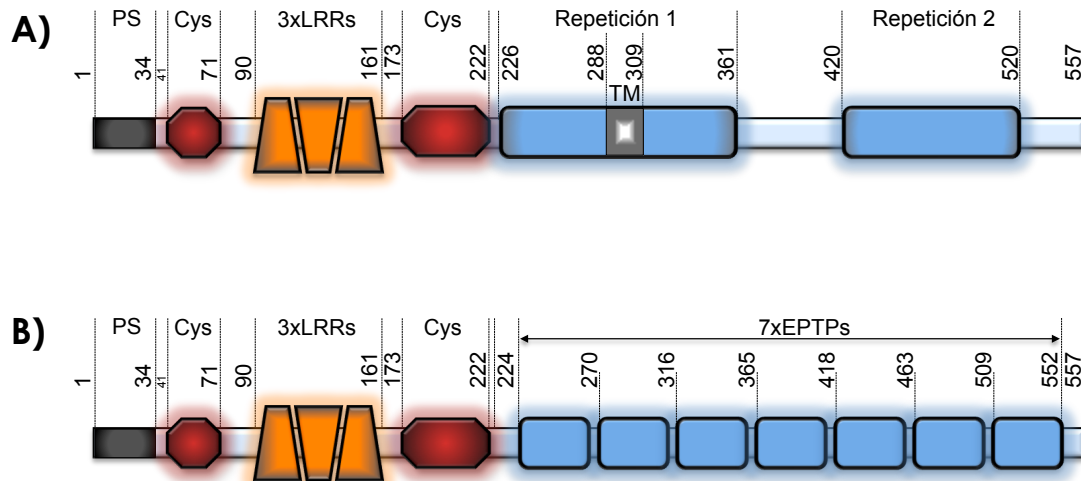


Figura 3. Representación de la estructura de dominios de LGI1. A) Arquitectura de dominios propuesta por Morante-Redolat *et al.*, (Morante-Redolat *et al.*, 2002): LGI1 presenta en su región N-terminal un péptido señal y repeticiones ricas en leucina, flanqueadas por dos regiones ricas en cisteína. En la región C-terminal, la proteína presentaría dos repeticiones no descritas hasta la fecha. B) Estructura de dominios propuesta por Scheel *et al.*, (Scheel *et al.*, 2002): la región N-terminal coincidiría con la propuesta en A), siendo diferente la región C-terminal, donde se encontrarían siete repeticiones del tipo EPTP o EAR (epilepsy-associated repeat).

1.3 Descubrimiento de la familia génica LGI.

1.3.1 Búsqueda de homologías para *LGI1* y descubrimiento de genes parálogos.

En 2002, Morante-Redolat y colaboradores (Morante-Redolat *et al.*, 2002) 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 de la proteína. Con ello, lograron identificar un parálogo de *LG11* codificado por el gen KIAA1916 (nº de acceso al Genbank AB067503) 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 aminoácidos y presentaba una identidad de 57% a nivel de nucleótido y una similaridad de 73% con la secuencia de *LG11*.

Combinando estudios *in silico* con estudios de clonaje posicional, Gu y colaboradores (Gu et al., 2002a) identificaron tres nuevos parálogos de *LG11*, que se denominaron *LG12*, *LG13* y *LG14*. Las tres proteínas codificadas por estos genes junto con *LG11*, constituirían una nueva subfamilia, denominada familia *LGI*, que estaría incluida dentro de la familia de las proteínas con repeticiones ricas en leucina. Para identificar estos genes, realizaron una búsqueda con la secuencia en humanos de *LG11* (NM005097) que se encontraba registrada en la base de datos del NCBI. Aquellas secuencias que contenían fragmentos del cDNA de *LG11*, 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 *LG12* humano, *LG13* humano y *LG14* humano, codificaban para unas proteínas de 545, 549 y 538 aminoácidos respectivamente. Según Gu y colaboradores, las tres nuevas proteínas presentaban idénticas estructuras comparadas con *LG11*, esto es, presentaban cuatro 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 *LG14*, todas las secuencias ricas en leucina de los tres parálogos presentarían una fenilalanina en la posición 20, integrando también estas nuevas proteínas en la familia F-20 de las proteínas ricas en leucina, familia a la que

pertenecerían también LGI1, Slit, Biglican y Osteomodulina. El porcentaje de similitud entre la secuencia de las cuatro proteínas sería de un 61-72% entre el dominio extracelular, y un 62-72% entre el dominio intracelular predicho por Chernova y colaboradores (Chernova et al., 1998). La secuencia transmembrana predicha para LGI1 (Chernova et al., 1998) presentaría el porcentaje de homología más dispar, yendo del 75% hasta el 99% de homología. Comparando las secuencias de los cuatro genes con sus correspondientes homólogos en ratón, encontraron un 97% de similitud en *LGI1*, 98% en *LGI2*, 97% en *LGI3* y 93% en *LGI4* (Gu et al., 2002a).

En un estudio similar y publicado simultáneamente que el de Scheel y colaboradores, Staub y colaboradores (Staub et al., 2002) utilizaron la secuencia del dominio en el extremo C-terminal de *LGI1* (dominio EAR), al que redefinieron como dominio EPTP (Epitempina) de unos 50 aminoácidos, 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, sino 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 siete 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 encontrada con número de entrada Hs. 352217, codificaría para una hipotética proteína con un dominio tipo trombospondina en su extremo N-terminal y cinco EPTPs en su extremo C-terminal, por lo que recibió el nombre de TNEP-1. El gen que la codifica 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. 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 et al., 2002).

En este mismo trabajo y utilizando métodos de predicción de hélices transmembrana más sensibles a los existentes en 1998 (Moller et al., 2001), Staub y colaboradores (Staub et al., 2002) no encontraron ninguna evidencia de que alguna de las cuatro proteínas LGI presentara un dominio transmembrana. Además, postularon que el nuevo dominio encontrado en el extremo C-terminal de los cuatro parálogos, se plegaría formando una estructura *beta propeller*, estructura que es incompatible con la presencia de un dominio transmembrana, y proponiendo así que las cuatro proteínas fueran proteínas de secreción (Staub et al., 2002).

1.4 Expresión de la familia LGI.

1.4.1 Expresión de la familia LGI a nivel de ARNm.

Dadas las diversas aproximaciones desde las que se ha tratado de estudiar la expresión de estos genes y las proteínas a las que codifican, tanto este apartado como el siguiente, se organizan en función de la técnica o grupo de técnicas empleadas para la determinación de la expresión de los ARNm o proteínas estudiados.

Northern blot.

Chernova y colaboradores obtuvieron una sonda de ARN a partir de un clon que contenía gran parte de la secuencia codificante de *LGII*, con la que hibridaron mediante *Northern blot* muestras de ARN de diversos tejidos humanos (Chernova et al., 1998) (figura 4).

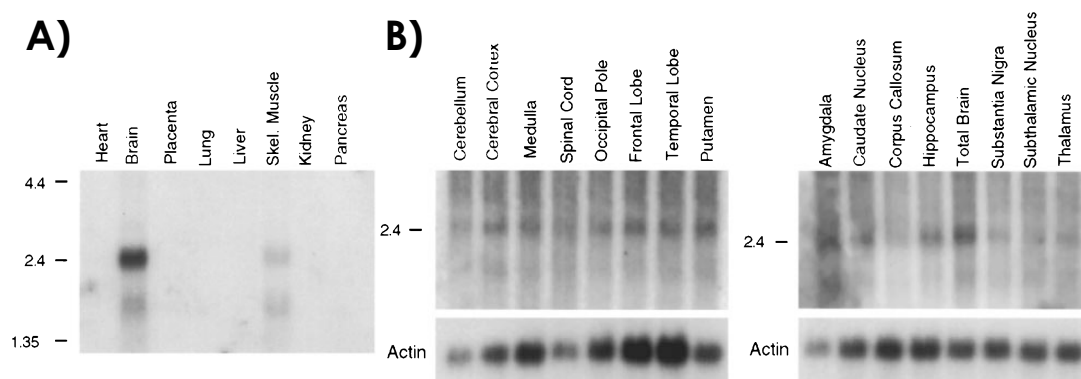


Figura 4. Northern blot del gen *LGII* mostrando la expresión de su ARNm. A) Expresión en distintos tejidos humanos. Pueden observarse una especie de 1,6 Kb y otra de 2,4 Kb. B) Expresión en diversas zonas del sistema nervioso central. (Extraído de (Chernova et al., 1998).

Como se puede observar en la figura 4A, *LGII* se expresa en cerebro y músculo esquelético, siendo la expresión mayoritaria en cerebro, pero no en corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón o páncreas. La sonda utilizada detectó dos transcritos: uno de 2,4 Kb y otro de 1,6 Kb. En el caso del cerebro, el transcrito más abundante resultó ser el de 2,4 Kb mientras que en músculo esquelético ambos transcritos se encontraron por igual.

Sin embargo, mediante la técnica de la RT-PCR que consigue un mayor grado de sensibilidad, Gu y colaboradores encontraron niveles bajos de ARNm de *LGII* en corazón, hígado y páncreas, encontrando niveles intermedios entre los observados en cerebro y el resto

de tejidos al analizar tejido aislado de nervio periférico (Gu et al., 2002b).

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 (figura 4B). La expresión máxima se observó en cerebro total, córtex, hipocampo y *putamen* y la mas baja en el *corpus callosum* (Chernova et al., 1998; Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002).

Posteriormente, Morante-Redolat y colaboradores mediante *Northern blot* a partir de ARNm de cerebro humano, además de las dos especies observadas por Chernova y colaboradores de 2,4 Kb y 1,6 Kb, observaron una tercera especie de 3,2 Kb. Mediante amplificación por PCR de una librería de ADNc, se clonaron las dos especies mayoritarias (2,4 Kb y 1,6 Kb) y se caracterizaron como isoformas provenientes del procesamiento alternativo del gen. La forma mayoritaria (2,4 Kb: *LG11^{FL}*, por *full length*) utiliza el sitio de procesamiento predicho previamente, mientras que la especie procesada alternativamente (1,6 Kb: *LG11^{SP}*, por *spliced*) aparece por la utilización de un sitio críptico de procesamiento localizado dentro del exón 8 (Morante-Redolat et al., 2002) (figura 5A). No se conocen las características de la banda de mayor tamaño (3,2 Kb), si bien podría deberse a la utilización de un sitio alternativo de procesamiento, una señal de poliadenilación diferente o simplemente tratarse de un artefacto por el uso de un fragmento de un EST como sonda para el *Northern blot*.

Mientras que la banda de 2,4 Kb correspondiente a la *LG11^{FL}* produce una proteína de 557 aminoácidos llamada LG11 o Epitempina a la que se le estima un peso molecular de aproximadamente 64 kD, la banda de 1,6 Kb correspondiente a la isoforma procesada *LG11^{SP}*, produce un proteína de 291 aminoácidos, con un peso mole-

cular estimado de aproximadamente 33 kD. El cambio en el sitio de procesamiento produce un cambio en la pauta de lectura, introduciendo 12 aminoácidos diferentes antes de encontrar el primer codón de parada prematuro, como puede observarse en la figura 5B.

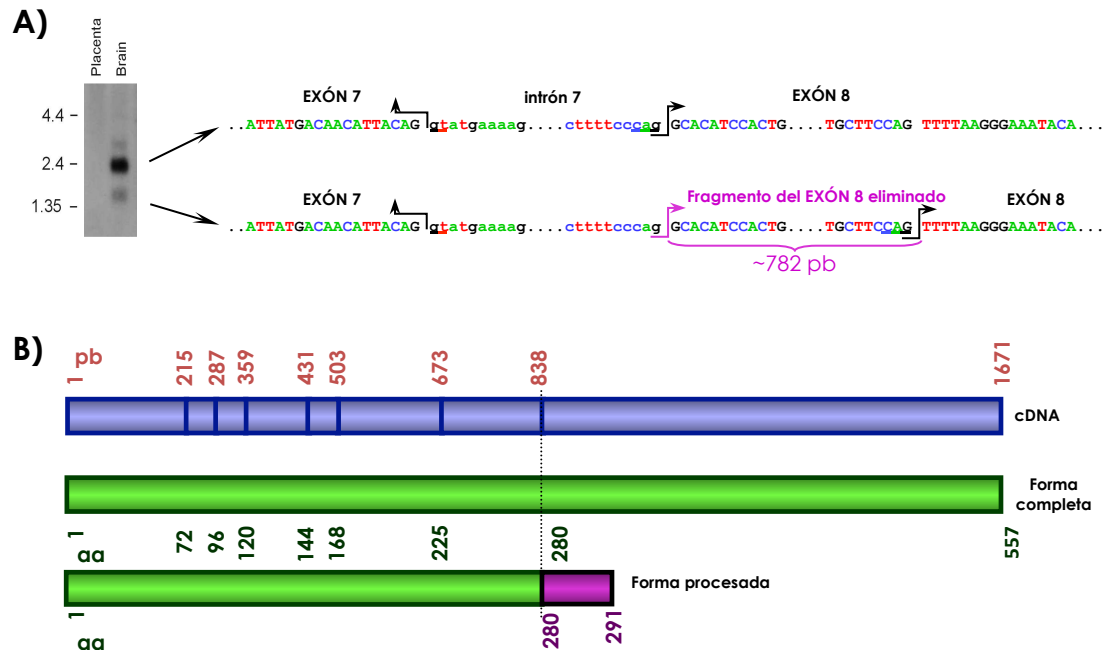


Figura 5. Procesamiento alternativo del gen *LGI1*. *LGI1* sufre un procesamiento alternativo dando lugar a dos isoformas de distinto tamaño. A) Procesado alternativo del intrón 7 mediante el uso de un sitio críptico de procesamiento situado 782 pb dentro del exón 8. B) Representación de las dos isoformas de *LGI1*. En caso de ser traducida la isoforma generada por procesamiento alternativo, ésta estaría formada por 291 aminoácidos, 12 de los cuales serían específicos de dicha isoforma.

RT-PCR.

El conocimiento acerca de la expresión del resto de miembros de la familia génica *LGI* no es tan profundo como en el caso de *LGI1*. En una primera aproximación, Gu y colaboradores estudiaron la expresión de los ARNm de *LGI1*, *LGI2*, *LGI3* y *LGI4* humanos, amplificando por PCR semi-cuantitativa a partir del ADNc de ocho tejidos

humanos distintos (Gu et al., 2002b) (figura 6). Aunque la distinta intensidad de bandas en una PCR semi-cuantitativo podría no correlacionar directamente con la cantidad de ARNm presente en el tejido de origen, se observaron diferencias importantes en la expresión de estos genes: se detectó expresión del RNAm tanto para *LG11* como para *LG14*, en todos los tejidos estudiados (corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo, riñón y páncreas), aunque su expresión era más alta en cerebro. Sin embargo, *LG12* sólo pudo ser detectada en corazón, cerebro y placenta. Se detectó *LG13* en todos los tejidos estudiados, pero se observó su presencia mayoritariamente en cerebro y pulmón (Gu et al., 2002b).

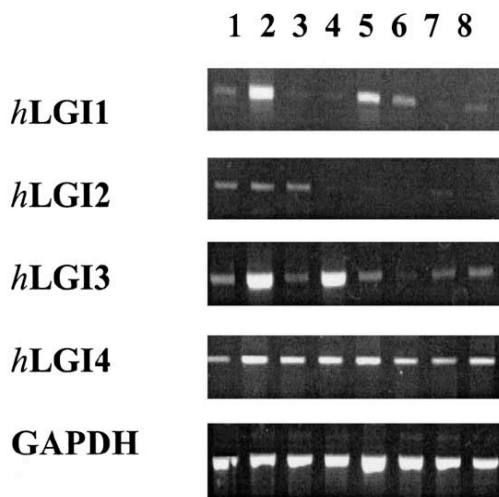


Figura 6. Expresión de los ARNm de los genes *LG11-4*. Carrera 1, corazón; carrera 2, cerebro; carrera 3, placenta; carrera 4, pulmón; carrera 5, hígado; carrera 6, músculo; carrera 7, riñón; carrera 8, páncreas. También se utilizaron primers contra *GADPH* para la normalización de la concentración de ARN. (Extraído de (Gu et al., 2002b)).

Hibridación in situ.

A nivel histológico existen varios trabajos publicados mostrando la expresión a nivel de ARNm de los cuatro genes de la familia *LGI*. Mediante hibridación *in situ* con sondas de ARN marcadas con digoxigenina, se detectó la expresión de estos genes en cortes de cerebro de ratón adulto. No obstante, ninguno de ellos plantea un análisis exhaustivo de la distribución de los ARNm de estos genes.

Kalachikov y colaboradores, publicaron los áreas cerebrales de mayor expresión de *LG11*, observando que las células con niveles más altos de expresión del ARNm de este gen, eran las localizadas en el córtex piriforme, región CA3 y giro dentado de la formación hipocámpica y amígdala (sobre todo basolateral anterior y posterior) (Kalachikov et al., 2002).

Por su parte, Runkel y colaboradores, demostraron por medio de un análisis de homología de secuencias que en el ratón, la región 3' UTR del gen *LG14*, solapaba con el último exón del gen *Fxyd3*, transcrito a partir de la otra cadena del ADN. Así pues, la disposición de ambos genes en el genoma murino, es similar a la de la mayoría de casos conocidos de *loci* regulados por RNAs. En este trabajo, mostraron que la expresión de ambos genes en diversos tejidos del ratón adulto coincidía en pulmón, epitelio uterino, glándulas mamarias, epitelio del intestino delgado y en cerebro en: córtex, giro dentado del hipocampo y células de Purkinje en el cerebelo. Solamente encontraron diferencias entre ambos genes en la pared de la vejiga, donde sólo se expresaba *Fxyd3* (Runkel et al., 2003).

Más adelante, en 2005, Senechal y colaboradores mostraron la expresión de los ARNm de los cuatro genes, confirmando los resultados previos de Kalachikov y colaboradores para *LG11*. Para *LG12*, observaron que los lugares de mayor expresión correspondían al córtex piriforme y sobre todo al núcleo reticular talámico. En cuanto a *LG13*, observaron unos bajos niveles de expresión, que aparecía marcado de forma difusa en todo el cerebro, únicamente observando un nivel de expresión más localizado en el núcleo del nervio facial. Por último, en el caso del gen *LG14*, los niveles de expresión fueron especialmente altos en la capa del células de Purkinje del córtex cerebelar (Senechal et al., 2005), sin embargo no se precisó un mapa detallado de expresión para estos genes.

Por último, Lee y colaboradores analizaron más profundamente la expresión de ARNm del gen *LGI3*. Determinaron que la expresión del gen era generalizada en el cerebro de ratón, pero con variaciones en cuanto a la zona estudiada. Así, observaron que los niveles de expresión más altos, correspondían a corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio y médula espinal (Lee et al., 2006).

1.4.2 Expresión de la familia LGI a nivel proteico.

Inmunohistoquímica.

La caracterización del patrón de expresión proteica de las proteínas de la familia LGI es complicada debido a la posibilidad de reacciones cruzadas entre anticuerpos dirigidos contra distintos miembros de la familia, factor que ya ha sido señalado previamente (Senechal et al., 2005). Este hecho se ve agravado por la ausencia de animales *knock-out* que pudieran servir como control de la especificidad de los anticuerpos generados.

Partiendo de esta premisa, existen varios trabajos en los que se han llevado a cabo estudios inmunohistoquímicos sobre cerebro de ratón usando anticuerpos contra proteínas LGI. Morante-Redolat y colaboradores, usaron anticuerpos policlonales generados en conejo a partir de inyecciones de péptidos sintéticos que formaban parte de la secuencia de LGI1. Dichos anticuerpos se usaron para estudiar el patrón de expresión proteica en secciones de cerebro de ratón adulto. Los resultados de este trabajo, señalaron que la expresión de LGI1 era eminentemente neuronal y distribuida ampliamente por todas las regiones cerebrales. Sin embargo, se observó un marcaje más evidente en las neuronas piramidales del hipocampo, giro dentado y corteza piriforme, probablemente debido a una mayor densidad celular o

tamaño de las células allí presentes. A nivel de célula individual, observaron un marcaje citoplasmático, encontrándose expresión tanto a nivel del soma como en los procesos neuronales (Morante-Redolat et al., 2002).

Por otra parte, Okabayashi y colaboradores, realizaron un estudio comparando la localización de LGI3 en cerebro de monos de edad avanzada, frente al de monos más jóvenes. En ese trabajo, indican que con el anticuerpo utilizado, se marcaron la mayoría de las neuronas del cerebro, localizándose dicho marcaje en la membrana y el núcleo en las células más grandes y sólo en el núcleo en las neuronas más pequeñas y en glía. También observaron que en monos de edad avanzada, LGI3 se acumulaba en gránulos cerca de la membrana, en lo que identificaron como estructuras endocíticas (Okabayashi and Kimura, 2007).

Western blot.

Senechal y colaboradores, aislaron los ADNc correspondientes a los genes *LGI1-4* a partir de cerebro de ratón adulto. A dichos ADNc, les introdujeron las etiquetas: Flag, en el caso de *LGI1*; HA en el caso de *LGI2* y *LGI4*; y Myc en el caso de *LGI3*. Tras ello, se clonaron en un vector de expresión en mamíferos y se transfectaron en células HEK 293T. Dichas células se cultivaron 36-48 h y se analizó la presencia de la proteína LGI transfectada en cada cultivo, por medio de anticuerpos específicos contra la etiqueta Flag, HA o Myc, y con un anticuerpo comercial contra *LGI1* (figura 7). Tras analizar tanto el medio condicionado resultante, como los lisados celulares, observaron que *LGI1*, 2, 3 y 4, estaban presentes en los medios condicionados obtenidos en el anterior proceso, mientras que su presencia en los lisados celulares correspondientes, podía sólo detectarse de forma residual tras concentrar dichos lisados y

aumentar los tiempos de exposición durante el revelado del *western blot*. Tan sólo LGI2 y LGI4, presentaban unos mayores niveles en el interior celular, lo que atribuyeron a una propiedad intrínseca de la proteína o a una posible interacción de la etiqueta utilizada en el proceso de secreción. Se observó también una reacción cruzada del anticuerpo específico contra LGI1, que también detectaba la proteína LGI3. Además, llevaron a cabo experimentos paralelos a los anteriores utilizando formas mutadas de las proteínas LGI, replicando algunas de las mutaciones encontradas en pacientes de ADLTE. Los resultados de estos ensayos, fueron que las proteínas mutadas, en contra de lo que ocurría con sus formas silvestres, se retenían en el interior celular. Concluyeron así que todos los miembros de la familia LGI, eran proteínas de secreción en células HEK 293T, y que las mutaciones de estas proteínas, provocaban la retención de éstas en el citoplasma celular (Senechal et al., 2005).

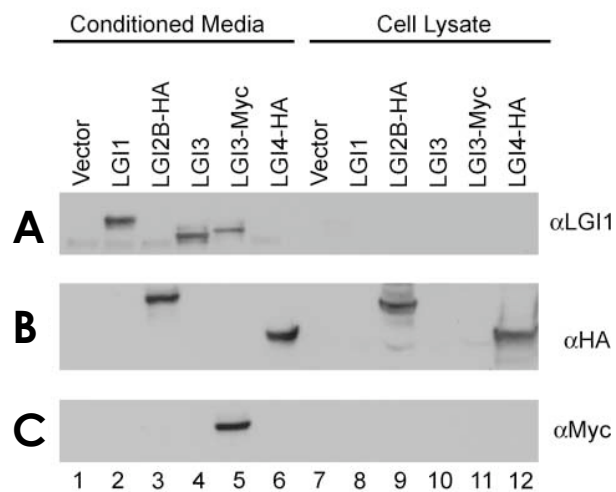


Figura 7. Western blot mostrando la expresión y secreción de las proteínas LGI1-4. A) Anticuerpo anti-LGI1. Se detectó tanto LGI1 en el medio, como LGI3 y LGI3-Myc (por reacción cruzada). B) Anticuerpo anti-HA. Se detectaron las construcciones etiquetadas con HA: LGI2 y LGI4, tanto en medio, como en los lisados (en menor medida). C) Anti-Myc detectó LGI3-Myc en el medio, pero no en los lisados. (Modificación de (Senechal et al., 2005)).

Por otra parte, Sirerol-Piquer y colaboradores corroboraron mediante experimentos similares dichos resultados, mostrando que LGI1 era secretada al medio extracelular en células HEK 293T, CHO, T98G, COS7 y PC12 diferenciadas con NGF. Por el contrario, tanto la forma procesada de LGI1 (LGI1^{SP}), como las distintas mutaciones utilizadas en sus experimentos, eran retenidas en el interior celular. Asimismo, comprobaron el papel de los dominios de la proteína en la secreción, concluyendo que tanto el dominio formado por las repeticiones ricas en leucina como el dominio formado por las repeticiones EPTP, son necesarios para el correcto plegamiento de la proteína y su entrada en la ruta de secreción. Por último, también demostraron que la proteína LGI1 sufría un proceso de N-glicosilación en el retículo endoplásmico. Mediante un tratamiento con la hidrolasa PNGasa F, observaron que la proteína sufría una deglicosilación, que se veía reflejada en una banda de menor peso molecular al detectar la proteína por *western blot*. Sin embargo, dicho cambio, no se observaba al mutar los sitios de glicosilación predichos con programas de predicción y tras tratar también con PNGasa F, demostrando así el efecto de la N-glicosilación en la proteína (Sirerol-Piquer et al., 2006).

1.5 Función de la familia LGI.

1.5.1 Función de LGI1.

La función de la proteína LGI1 no se conoce por completo, y pese a que su conocimiento ha tenido un gran avance recientemente, aún no se tiene información de su mecanismo de acción exacto. A continuación se detallan las diversas hipótesis planteadas desde su descubrimiento, de forma más o menos cronológica.

Gen supresor de tumores.

LG11 fue identificado inicialmente por el grupo de Cowell en 1998, tratando de identificar genes implicados en la aparición y progresión de glioblastomas (Chernova et al., 1998).

El glioblastoma es el tumor maligno más común en el sistema nervioso central adulto. La mayoría se desarrolla rápidamente a partir de astrocitos o células precursoras gliales sin que existan evidencias de la presencia de un estado tumoral de menor malignidad, denominándose glioblastomas primarios o *de novo*. La esperanza de vida en estos casos es muy baja, no superando normalmente los tres meses. El resto de glioblastomas tienen un proceso de evolución en el que va creciendo la malignidad detectándose inicialmente astrocitomas de bajo grado o, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) gliomas de grado II, en un estadio más avanzado astrocitomas anaplásicos o de grado III y finalmente glioblastomas secundarios o de grado IV los cuales poseen una gran capacidad invasiva (Ohgaki, 2005).

Estudios moleculares y citogenéticos indican que la pérdida de una copia completa del cromosoma 10 es el evento más común en glioblastomas de alto grado, exponiendo mutaciones recesivas en el alelo restante. Se ha demostrado que en aproximadamente un 80% de los tumores de glioblastoma multiforme (GBM) existe reagrupamiento o pérdida de alguna parte de la segunda copia del cromosoma 10, especialmente de la región 10q28-26. Por ello clonar genes interrumpidos por translocaciones cromosómicas es un método útil para la identificación de genes importantes en tumorigénesis.

El grupo de Cowell estudiaba la línea celular de glioblastoma T98G, la cual 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). En el punto de ruptura de la translocación, localizaron un gen interrumpido, el cual lograron identificar y aislar. Debido a que este gen codificaba para una proteína con dominios de repeticiones ricas en leucina, le llamaron *LG11* por *Leucine-rich Glioma Inactivated-1* (Chernova et al., 1998). Por todo esto se propuso *LG11* como gen candidato de supresión de tumores (TSG).

Para comprobar esta hipótesis distintos grupos realizaron estudios de reordenamiento cromosómico, tanto en líneas celulares de glioblastoma como en tumores cerebrales de distinto grado, que afectaran a *LG11*, así como sus niveles de expresión. Descubrieron que existe una reducción de la expresión de *LG11* en gliomas, que parece estar asociada a la gravedad y estado avanzado del tumor, encontrándose niveles algo reducidos en glioblastomas de bajo grado y muy reducidos o nulos en glioblastomas de alto grado y en líneas celulares de glioblastoma. El grupo de Cowell detectó niveles reducidos o nulos de *LG11* mediante RT-PCR y encontraron evidencias de reorganizaciones cromosómicas para algunas líneas celulares (23%) y tumores cerebrales (39%) (Chernova et al., 1998).

Posteriormente Somerville y colaboradores secuenciaron *LG11* en busca de mutaciones en tumores de glioblastoma multiforme y líneas celulares de glioblastoma, sin encontrar mutaciones en ninguno de ellos, por lo que parece que mutaciones en *LG11* no son un evento común en la tumorigénesis de glioma (Somerville et al., 2000). Otro modo de silenciar la expresión de genes supresores de tumores es por metilación del promotor u otros elementos regulatorios responsables de la expresión del gen. Por lo que realizaron estudios para determinar el estado de metilación del ADN genómico cercano a *LG11* en tumores de glioblastoma y cerebro normal, sin observar diferencias entre ellos. Para probar estos resultados trataron células

de glioblastoma con 5-azacitidina, la cual revierte el bloqueo de la expresión génica inducido por metilación y observaron que, pese a variar el estado de metilación, no lograron la reexpresión de *LG11* en estas líneas celulares (Somerville et al., 2000).

El grupo de Krex por su parte, concluyó mediante estudios de RT-PCR que en líneas celulares de glioblastoma y en tumores cerebrales, la expresión de *LG11* era muy baja o nula y que, además, deleciones, translocaciones, mutaciones en la secuencia codificante o el promotor de *LG11*, no son un hecho clave en el desarrollo de gliomas. No está claro el mecanismo por el cual se inactiva la expresión de *LG11* (Krex et al., 2002). A su vez, la reducción en los niveles de ARNm de *LG11* asociada al estado del glioma se ha confirmado a nivel de proteína, Besleaga y colaboradores realizaron estudios de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal específico de *LG11* sobre muestras de 40 tumores primarios en diferentes estados de evolución, encontrando 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 et al., 2003).

Sin embargo, trabajos posteriores revisaron los patrones de expresión para *LG11* y concluyeron que los datos aportados hasta la fecha apuntaban a una expresión principalmente neuronal en el cerebro y prácticamente indetectable en la glía (Gu et al., 2002a; Piepoli et al., 2006). Así, la expresión observada en los tumores primarios de glioblastoma provendría realmente de células neuronales "contaminantes" atrapadas en el tumor, y la disminución progresiva de expresión paralela al grado de evolución del glioma, sería consecuencia de la pérdida o desplazamiento de estas neuronas a favor de las células tumorales, que al ser derivadas de la glía, expresarían niveles muy bajos o nulos de *LG11*. Ésta sería una

explicación mucho más sencilla a la reducción de la expresión de *LG11* en glioblastomas, sin embargo es opuesta a la hipótesis de *LG11* como gen supresor de la metástasis (Piepoli et al., 2006).

Otra aproximación experimental para el estudio de los genes supresores de tumores es la reexpresión forzada del gen en células tumorales que han perdido la expresión. En caso de tratarse de un gen supresor de tumores, la reexpresión del gen debería cambiar el fenotipo tumoral y las propiedades biológicas de la célula, disminuyendo el potencial de proliferación celular y/o la capacidad invasiva de las células. El grupo de Krex, analizó el efecto de la reintroducción de *LG11* en dos líneas celulares de glioblastoma que tienen bajos niveles de *LG11* y otras dos con niveles no detectables del gen endógeno. Se utilizó un *cassette* de expresión constituido por la ORF de *LG11* seguida de una secuencia de reconocimiento IRES y la Proteína Fluorescente Verde (GFP), de manera que asumieron expresión positiva de *LG11* exógeno en las células positivas para GFP. Ninguna de las cuatro líneas infectadas mostró diferencias en la capacidad proliferativa al compararlas con células control infectadas con la construcción sin inserto. Además, mediante estudios de ciclo celular, se demostró que no había diferencias significativas del número de células en fase S. Por otra parte en un experimento de migración celular demostraron que con la reexpresión de *LG11* tampoco había diferencias entre células control y las infectadas con la construcción (Krex et al., 2002).

Posteriormente el grupo de Cowell utilizó una estrategia similar: se transfectó una construcción de *LG11* fusionada al epítipo FLAG y se obtuvieron líneas celulares estables a partir de líneas de glioblastoma con niveles detectables de *LG11* endógeno (U87) o niveles nulos (T98G y A172). Los estudios de crecimiento celular mostraron que no había una diferencia significativa entre los clones

obtenidos a partir de la línea celular de glioblastoma U87 y su línea parental, mientras que los clones de T98G y A172 con *LG11* crecían más lentamente que sus correspondientes líneas parentales. Además clones con menor expresión de *LG11* mostraron una caída del crecimiento celular más suave que aquellos clones en los que había una expresión mayor. Por otra parte realizaron estudios de migración celular a través de una matriz de BD Matrigel, todos los clones que expresaban *LG11* provenientes de T98G y A172 habían perdido casi por completo su capacidad de migrar a través de la matriz de matrigel al compararlos con sus correspondientes líneas parentales. Por el contrario, la reintroducción de *LG11* en U87 no tuvo efecto en la migración de sus clones. Además otra característica de las células tumorales es su capacidad de crecer en condiciones independientes de anclaje. Ensayos de formación de colonias en *soft-agar* mostraron que las células transfectadas con *LG11* de T98G y A172 tenían una capacidad menor de formar colonias que las líneas parentales, mientras que las células transfectadas con *LG11* de U87 no mostraban ninguna inhibición del potencial para crecer en condiciones independientes de anclaje: no había diferencias significativas del número de colonias entre las células U87 con *LG11* y su correspondiente línea parental. Los resultados de los experimentos de tasa de crecimiento, migración celular y capacidad de crecimiento en condiciones independientes de anclaje apuntan a *LG11* como gen supresor de tumores (Kunapuli et al., 2003). En un trabajo posterior, el grupo de Kunapuli estudió el modo en que *LG11* realiza su función regulando rutas específicas de señalización, para ello compararon los patrones de expresión a nivel global de células T98G control y T98G forzadas a expresar *LG11* de manera exógena mediante análisis de microarray. Como consecuencia de la reexpresión de *LG11* se observó una expresión disminuida de genes relacionados con la matriz extracelular, entre ellos genes de la familia de las Metaloproteasas de

Matriz Extracelular (MMPs), en concreto MMP1 y MMP3. Estas proteínas se han relacionado con el control de la proliferación y la invasión celular, ya que se trata de endopeptidasas de la matriz celular. Se ha sugerido que pueden estar implicadas en el proceso de invasión de los gliomas, los cuales requieren degradación de la matriz extracelular para poder filtrarse e invadir los tejidos circundantes. Además también se observó una expresión aumentada de TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*), la cual es un antagonista de la acción de las MMPs. Dado que la expresión y la activación de MMP1 y MMP3 están reguladas por las rutas de p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), analizaron el estado de activación de estas rutas en las células T98G transfectadas con *LG11* encontrando una reducción en los niveles de fosforilación de ERK1/2 pero no en los de p38 en estas células comparando con las células control, ello sugiere que *LG11* podría estar controlando la expresión de MMP1/3 a través de las rutas ERK1/2 (figura 8). A continuación estudiaron el modo en que la ruta ERK1/2 regulaba la producción de MMP1/3 mediada por *LG11* y propusieron que la reintroducción de *LG11* en células T98G promueve la fosforilación de AKT mediada por la PI3-quinasa lo que inhibe la cascada de MAPK Raf-MEK-ERK1/2 reduciendo en última instancia la expresión de las MMPs (Kunapuli et al., 2004).

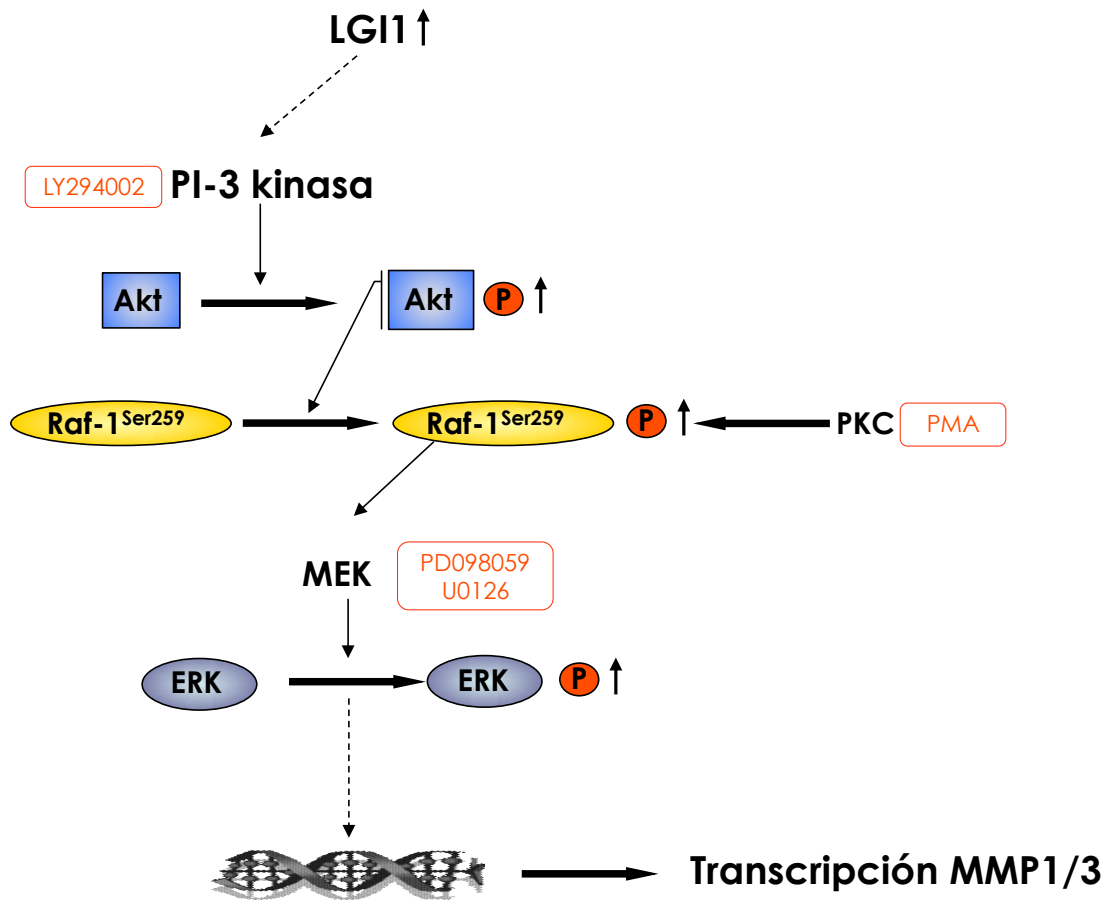


Figura 8. Representación esquemática del efecto de la expresión de LGI1 sobre la ruta ERK1/2. PD098059 y U0126 inhiben a MEK1, mientras que PMA es un activador de PKC, ya que activa la ruta de señalización RAF1-MEK-ERK. LY294002 por su parte, es un inhibidor de PI3K. (Modificado de (Kunapuli et al., 2004)).

Estos resultados apoyarían el papel de *LGI1* como gen supresor de tumores o más bien como gen supresor de la metástasis, ya que su inactivación en células de glioblastoma eliminaría la producción de MMPs implicadas en la elevada capacidad invasiva de los glioblastomas de alto grado.

Papel en la ruta de señalización de la inhibición de la regeneración mediada por mielina.

Ensayos de doble híbrido en levadura llevados a cabo en nuestro laboratorio dieron a ver que LGI1 era capaz de interactuar con tres proteínas que se encuentran implicadas en la ruta de señalización de la inhibición de la regeneración de neuritas mediada por la mielina en el sistema nervioso central (SNC): el receptor de Nogo (NgR o RTN4R), el inhibidor de RhoA (RhoGDI) y el receptor de neurotrofinas p75^{NTR}. Posteriormente mediante sistemas de sobreexpresión de líneas celulares eucariotas se comprobó que únicamente lo hacía con NgR y p75^{NTR}, además estudiaron la interacción con la proteína Lingo1, la cual es el tercer componente junto con NgR y p75^{NTR} del complejo señalizador de los inhibidores presentes en la mielina.

Este complejo molecular se encuentra en la base de que, mientras el sistema nervioso periférico (SNP) es capaz de regeneración tras una lesión, el sistema nervioso central (SNC) no lo sea. Para que la regeneración axonal sea posible, la neurona lesionada debe sobrevivir, el axón seccionado ha de poder formar de nuevo un cono de crecimiento, elongarse hasta alcanzar su diana original, establecer sinapsis y por último ser remielinizado (aunque esto último depende del tipo de conexión). Si bien este proceso ocurre en el SNP y en el SNC durante el desarrollo, no sucede así en el SNC maduro. A medida que esta maduración tiene lugar, ocurre un descenso en la capacidad de regeneración neuronal, hasta el punto de perderse en estadios tempranos postnatales. A este descenso contribuyen tanto factores exógenos como endógenos (Horner and Gage, 2000).

La pérdida de capacidad endógena de regeneración axonal de las neuronas centrales durante el desarrollo ocurre en respuesta a

diversos estímulos, como son la activación del programa endógeno de maduración de la neurona, el contacto con el tejido diana o la llegada de aferentes sinápticos. Estos estímulos desencadenan en la neurona una serie de cambios que se podrían agrupar en tres bloques: un descenso en los niveles de moléculas promotoras del crecimiento axonal, el inicio de la expresión de receptores para moléculas inhibitorias y un descenso en los niveles de AMPc (Horner and Gage, 2000; Selzer, 2003).

Una vez establecidas las conexiones neuronales, el SNC pasa de ser permisivo para el crecimiento axonal a constituir un ambiente mucho más restrictivo. Gran parte de la inhibición constitutiva del SNC radica en la presencia de ciertas moléculas en asociación con la mielina. A finales de los ochenta, trabajos llevados a cabo por el grupo de Schwab demostraron por primera vez la fuerte inhibición que la mielina ejerce sobre el crecimiento neuronal se debe a ciertas proteínas en su composición (Caroni and Schwab, 1988). Hasta la fecha se han identificado tres proteínas, Nogo-A, MAG y OMgp, que son capaces de interaccionar con el mismo receptor neuronal llamado Receptor de Nogo o NgR para prevenir el crecimiento axonal (Sandvig et al., 2004). Además de NgR, que utiliza tres correceptores: Lingo1, p75^{NTR} y Troy (figura 9); existen receptores adicionales para Nogo-A y MAG. Los resultados obtenidos por nuestro grupo relacionan LGI1 con este complejo molecular (tesis doctoral, (Morante-Redolat, 2006)).

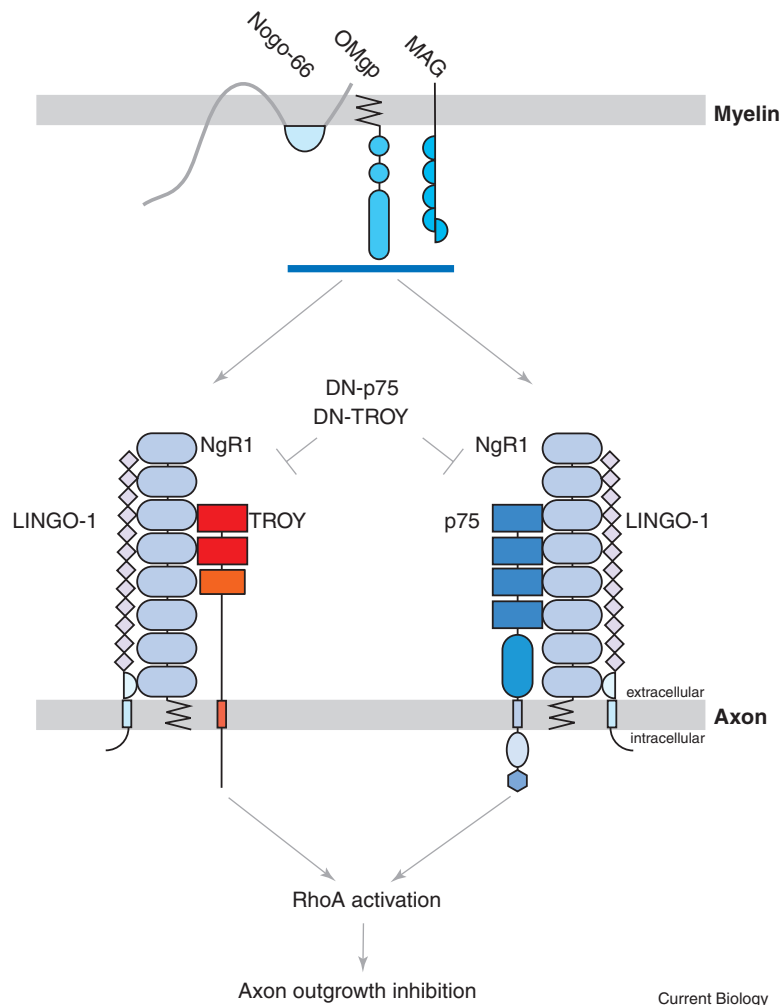


Figura 9. Representación de los dos complejos implicados en la inhibición de la regeneración del SNC mediada por mielina. Los componentes inhibitorios de la mielina Nogo-66, OMgp y MAG se unen al receptor común NgR, el cual puede formar complejos ternarios mediante su unión a Lingo1 y p75NTR o bien a Lingo1 y Troy, e inhibir la regeneración axonal. (Extraído de (Mandemakers and Barres, 2005)).

Desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (SNC).

Atendiendo a sus dominios estructurales LGI1 es una proteína que pertenece a la superfamilia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRRs). Las LRRs son "módulos" pequeños de proteína caracterizados por una distribución periódica de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente residuos de leucina (Leu), que se encuentran separados por residuos hidrofílicos. Dentro de esta

superfamilia se encuadraría dentro de la subfamilia F-20, que se caracteriza por la conservación de un residuo fenilalanina en posición 20 (Buchanan and Gay, 1996). Cada dominio LRR consta de 24 aminoácidos y contiene la secuencia consenso típica: X L (X₂) L X L (X₂) N X I (X₂) L P (X₃) **F** (X₂) L X. Además las LRRs están flanqueadas a ambos lados por regiones ricas en cisteínas (Cys), que siguen las secuencias consenso para las regiones ricas en cisteínas:

- Flanqueantes en N-terminal: **C** P (X₂) **C** X **C** (X₆) **C**

- Flanqueantes en C-terminal: X X **C** X **C** (X₂₀) **C** (X₂₀) **C**

Este tipo de organización, dominios LRRs flanqueados en ambos extremos por regiones ricas en leucinas, es característico de proteínas extracelulares, lo que sugiere que *LGII* podría ser una proteína de secreción. Los LRRs se han asociado con distintas funciones, principalmente interacciones proteína-proteína, aunque también con transducción de señales, adhesión celular y desarrollo entre otras. Esta región alinea muy estrechamente con las proteínas de *Drosophila* Slit, Toll, y Tartan, así como a la familia génica Trk de mamífero, en las cuales se conoce que las LRRs unen el factor de crecimiento nervioso y otras neurotrofinas. Los genes *Slit* y *Tartan* son necesarios para el desarrollo del SNC. La proteína Tartan parece que funciona como una proteína asociada a membrana, implicada en la adhesión celular, mientras que las proteínas Slit 1 y Slit 2, tanto de *Drosophila* como de vertebrados, están implicadas de diferentes formas en el mecanismo de crecimiento del cono axonal y en la migración neuronal. Estos estudios, sugieren que *LGII* podría estar implicado en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (Kalachikov et al., 2002; Krex et al., 2002).

Otro hecho característico en la secuencia de *LGII* es la presencia de siete copias de la repetición EPTP de función

desconocida, aunque probablemente esté relacionada con el desencadenamiento de epilepsia. Se ha propuesto que estas siete copias se dispongan como un dominio de tipo *β -propeller*, este dominio es característico de interacciones proteína-proteína (Staub et al., 2002).

Un trabajo que apoya el posible papel de LGI1 en el desarrollo del sistema nervioso central, es el llevado a cabo por Sagane y colaboradores. En este trabajo se observó que LGI1 interacciona con la proteína ADAM22 en cerebro de ratón por medio de inmunoprecipitación y análisis espectrométrico de masas. ADAM22 es una proteína transmembrana de la que se piensa que es una molécula de adhesión o un receptor por la presencia de repeticiones ricas en cisteína y secuencias de tipo disintegrina en su ectodominio. Además, el fenotipo del ratón deficiente en ADAM22 se caracteriza por un desarrollo deficiente del sistema nervioso periférico. Por otra parte, también se establecieron interacciones tanto de LGI1 como de LGI4 (con una menor afinidad) con otros miembros de la familia ADAM (Sagane et al., 2008).

Recientemente, (Owuor et al., 2009) publica un trabajo en el que observan que AP-LGI1 se une de forma dosis-dependiente a la superficie celular de cultivos primarios de neuronas de ganglios basales de la raíz dorsal (DRG) de pollo y en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata. En dicho trabajo se observa también que AP-LGI1 no tiene capacidad de unión a células COS7 no transfectadas por si sola, necesitando para dicha unión de la expresión de la proteína ADAM23. Tras ensayar la capacidad de unión de varios miembros de la familia ADAM, determinan que ADAM23 es el receptor específico para LGI1 en la superficie celular y dada la capacidad de ADAM23 para interaccionar con integrinas tipo $\alpha\beta3$, moléculas de adhesión implicadas en el desarrollo de neuritas (Cal et

al., 2000), comprobaron que LGI1 actúa como ligando de ADAM23 y estimula el crecimiento de neuritas en neuronas DRG y neuronas de hipocampo. Además, se determinó que el ratón *knock-out* para ADAM23, presenta crisis de tipo tónico/clónico y una viabilidad reducida. No obstante el ratón heterocigoto ADAM23 +/-, pese a tener una viabilidad y comportamiento normales, presentaba una mayor susceptibilidad a sufrir crisis inducidas por pentilenotetrazol (PTZ), con un umbral de dosis más bajo. De esta forma, estos autores proponen que LGI1 es un ligando que ejerce su función a través del receptor ADAM23, que a su vez promueve el crecimiento de neuritas. La reducción de dosis en pacientes de ADLTE con LGI1 mutado, llevaría a un desarrollo de las neuritas insuficiente y como consecuencia, a un sistema nervioso más susceptible a sufrir crisis de tipo epiléptico (Owuor et al., 2009).

LGI1 como responsable del modelado estructural y maduración de sinápsis glutamatérgicas en el hipocampo.

Los últimos trabajos sobre la función de LGI1 contienen resultados dispares. De un lado, Schulte y colaboradores observaron que LGI1 forma complejos con la subunidad Kv1.1 de los canales de potasio activados por voltaje (Kv). Estos canales modulan la transmisión sináptica en las neuronas del sistema nervioso central (SNC). Según los resultados de este trabajo, LGI1 y Kv1.1 co-ensamblan con Kv1.4 y Kvβ1 en terminales axónicos de la formación hipocampal. En dichos complejos, LGI1 evita selectivamente la inactivación de tipo-N que la subunidad Kv1.1 ejerce sobre estos canales. Por el contrario, formas mutadas de LGI1 de las encontradas en pacientes de ADLTE no tienen la capacidad de ejercer dicho efecto, resultando en una cinética de inactivación más rápida de lo habitual en canales de este tipo, lo cual podría desencadenar en actividad epiléptica (Schulte et al., 2006).

De otro lado, el hallazgo más relevante en torno a esta cuestión, lo desvelaron recientemente Zhou y colaboradores al presentar un trabajo donde desvelaban fehacientemente al menos una de las funciones *in vivo* de LGI1 en el SNC. Dichos autores señalan que la proteína LGI1 interviene en el proceso de estructurado y maduración funcional de sinápsis de tipo glutamatérgico en neuronas del hipocampo durante el desarrollo postnatal del cerebro. Para ello compararon la maduración de terminales presinápticos y postsinápticos de ratones normales, con ratones que expresaban una forma truncada de LGI1 y ratones que sobreexpresaban la forma silvestre de LGI1. Los resultados fueron que la forma truncada de LGI1 evitaba la correcta maduración de las funciones pre y post sinápticas, mientras que la sobreexpresión de la forma silvestre de LGI1 la aumentaba. Lo mismo ocurría con el remodelado dendrítico, que era deficiente en el caso de LGI1 mutada y que se compensaba con una mayor densidad de espinas dendríticas. Además, dado que LGI1 co-purifica con canales Kv1.1, aumenta la actividad de dichos canales *in vitro* y que ambos se expresan abundantemente en las sinápsis glutamatérgicas de las células de la vía perforante del hipocampo, se especuló con la posibilidad de que LGI1 estuviera afectando a la maduración de la función presináptica por medio de su acción sobre estos canales. Dicha hipótesis se comprobó al comparar las sinápsis de las células de dicha vía en ratones normales, ratones que expresaban una forma truncada de LGI1 y ratones que sobreexpresaban la forma silvestre de LGI1. Los resultados de dicha observación fueron que la maduración estaba inhibida en el caso del ratón con la forma truncada de LGI1, mientras que estaba amplificada en el caso del ratón que sobreexpresaba la forma silvestre. Confirmado lo anterior, se pensó también que la forma truncada de LGI1 podría aumentar la transmisión sináptica excitatoria en esas células, lo cual se comprobó mediante estudios electrofisiológicos que validaron dicha hipótesis. Como consecuencia

de ello, se decidió estudiar el efecto de una transmisión sináptica aumentada sobre la susceptibilidad a padecer crisis epilépticas inducidas por picrotoxina. Se observó que los ratones que expresaban la forma truncada de *LG11*, tenían una mayor susceptibilidad a sufrir crisis que los ratones que expresaban la forma silvestre, o que el ratón de sobreexpresión (Zhou et al., 2009).

1.5.2 Función de *LG12*.

LG12 es el miembro de la familia *LG1* del que menos información se dispone hasta el momento. En familias de genes poco caracterizadas, un marco de trabajo basado en el análisis evolutivo y de expresión, es una buena aproximación para el estudio de qué genes son en principio más importantes funcionalmente y por ende, susceptibles de ser responsables de enfermedades en humanos. En el caso que nos ocupa, *LG11* ya ha sido implicado como responsable de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante, por lo que miembros de la misma familia, podrían estar relacionados con enfermedades similares.

Los estudios filogenéticos llevados a cabo sobre la familia *LG1*, muestran que este grupo de genes no está presente en el genoma de invertebrados, y que surgió en el linaje que dio lugar a los actuales vertebrados. El hecho de que estos genes se expresen mayoritariamente en tejidos de origen neural en pez cebra, parece indicar que esta familia de genes, podría estar implicada en la evolución del cerebro de vertebrados. En estos mismos estudios se demuestra que, en este organismo, el origen de la familia se debe a dos sucesos de duplicación, que bien pudieran deberse a duplicaciones genómicas completas. Además, se ha observado que en el mencionado pez cebra, estos genes muestran patrones de expresión complementarios,

lo que podría indicar una subfuncionalización de los miembros de la familia *LGI* a lo largo de la evolución (Gu et al., 2005).

Senechal y colaboradores, aportaron información adicional al respecto estudiando el patrón de expresión cerebral del ARNm de *LGI2*, y demostrando que su expresión en el núcleo reticular talámico, destacaba sobre la observada en el resto del sistema nervioso central. Además, determinaron que al transfectarse *LGI2* en células en cultivo para su sobreexpresión, la proteína codificada, era secretada al medio extracelular. No obstante, aunque valiosa, esta información no ha proporcionado una evidencia firme acerca de la posible función de esta proteína (Senechal et al., 2005).

1.5.3 Función de *LGI3*.

Hasta la fecha, varios estudios han demostrado que el péptido beta-amiloide (Abeta), aumenta la expresión de *LGI3* y que ambas proteínas, colocalizan en la membrana celular en cultivos de astrocitos de rata (Kimura et al., 2007; Okabayashi and Kimura, 2007; Okabayashi and Kimura, 2008). Además también se ha observado, que tanto la proteína GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), como la apolipoproteína E (ApoE), incrementan significativamente sus niveles con la sobreexpresión de *LGI3* inducida por Abeta, sugiriendo que la activación de la proteína *LGI3* podría estar implicada en la respuesta astrogliar contra Abeta (Kimura et al., 2007). Estos datos vienen apoyados por el hecho de que al reducir la expresión de *LGI3* mediante el uso de ARN de interferencia, se observa una clara inhibición de la internalización de Abeta por parte de astrocitos en cultivo (Okabayashi and Kimura, 2008). De este modo, *LGI3* según estos autores, estaría involucrada en la respuesta de los astrocitos a la acumulación del péptido Abeta.

Por otra parte, en neuronas de monos de avanzada edad, LGI3 se acumula en la membrana plasmática o cerca de ella, donde colocaliza con proteínas asociadas a endocitosis y marcadores específicos de *lipid rafts* (Okabayashi and Kimura, 2007). Además, Park y colaboradores han demostrado por medio de técnicas de *pull-down*, coimmunoprecipitación y colocalización, que syntaxina-1, un componente del complejo SNARE de la ruta de exocitosis, está asociada a la proteína LGI3, con la cual interacciona de forma física (Park et al., 2008). Los resultados obtenidos de estos dos últimos estudios, sugieren que LGI3 podría jugar un papel regulador en la endocitosis neuronal (Okabayashi and Kimura, 2007), y también en la exocitosis, por medio de su interacción con syntaxina-1 (Park et al., 2008).

1.5.4 Función de LGI4.

La proteína LGI4 ha sido relacionada con varios procesos celulares. En primer lugar, Bermingham y colaboradores, demostraron que el fenotipo *claw paw* de ratón, estaba causado por una mutación en el gen *LGI4*. Dicha mutación, surgió espontáneamente en los *Laboratorios Jackson*, en ratones C57/BL6-*ob* y fue denominada mutación *clp*, de herencia recesiva. El fenotipo *claw paw* que produce dicha mutación, se caracteriza por anomalías posturales e hipomielinización periférica, sin signos de desmielinización en el sistema nervioso central. Por ello, LGI4 parece tener un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso periférico. En este trabajo, se llevó a cabo la clonación posicional del gen *LGI4*, que sufría una inserción de un elemento repetitivo presente en el exón 3. Tras producirse una duplicación de dicho elemento, éste se inserta en sentido opuesto en el exón 4 del alelo *clp*, impidiendo el correcto procesamiento de dicho exón al interrumpir el sitio de *splicing* 3' del exón 3, resultando en la ausencia de 24 aminoácidos en la proteína mutante respecto a la silvestre (figu-

ra 10A y 10B). Además, se demostró que la mutación *clp* producía la retención de la proteína LGI4^{*clp*} en células CHO en cultivo, mientras que la forma silvestre era secretada al medio extracelular. El hecho de que esta molécula ejerce su función extracelularmente, fue demostrado por partida doble: primero porque al regular a la baja la expresión de la forma silvestre de LGI4 en co-cultivos de neuronas y células de Schwann, la mielinización se vio inhibida; y segundo, porque al añadir LGI4 exógena a co-cultivos *clp/clp*, la mielinización se vio restaurada (Bermingham et al., 2006).

Por otra parte, y como se mencionó en el apartado sobre la función de LGI1, los resultados de ensayos de inmunoprecipitación y análisis espectrométrico de masas de extractos de proteínas de cerebro de ratón, relacionaron las proteínas LGI1 y LGI4 con la proteína ADAM22. Análisis más exhaustivos, permitieron ver que LGI1 y LGI4 pueden unirse tanto a ADAM22, como a ADAM11 o ADAM23 con diferentes niveles de afinidad. De hecho, parece que ADAM23 funciona como receptor de LGI1 en células que no expresan ADAM22, y por lo tanto, estos sistemas podrían estar regulados no sólo por afinidad, sino también por la expresión específica de cada proteína por parte de cada tipo celular (Sagane et al., 2008).

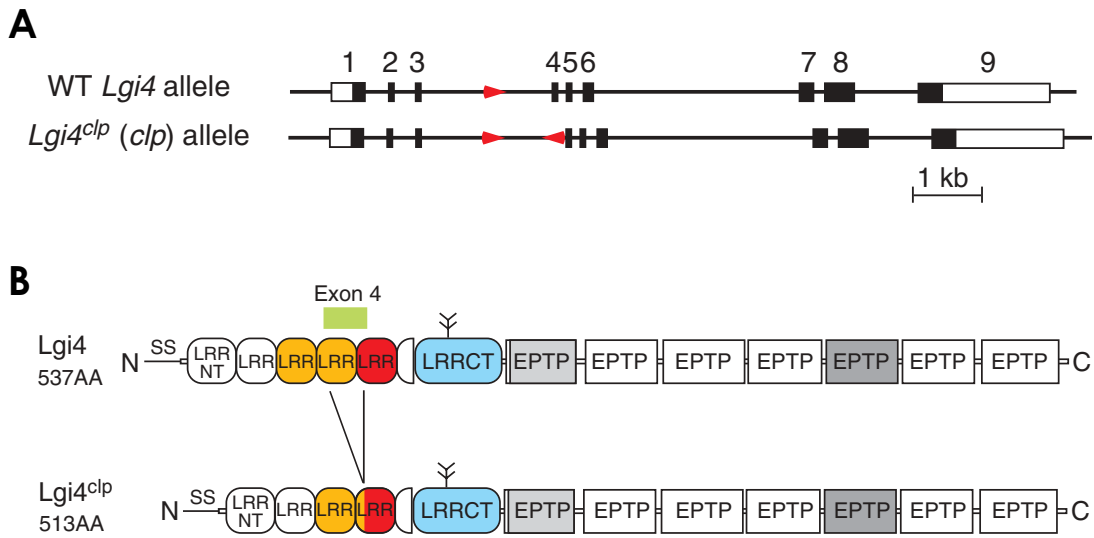


Figura 10. Representación esquemática del efecto de la mutación *clp* sobre *LG14*. A)

El alelo silvestre *LG14^{wt}*, contiene un elemento repetitivo (marcado en rojo) en el intrón 3 que en el alelo mutado *LG14^{clp}*, ha sufrido una duplicación y se ha insertado en el exón 4 en sentido contrario, impidiendo su correcto procesamiento. B) Estructura de las proteínas *LG11^{wt}* y *LG14^{clp}*. El efecto de la mutación *clp*, da lugar a una proteína con 24 aminoácidos menos (537 aa contra 513 aa), que afectan al dominio de repeticiones ricas en leucina. SS, hace referencia al péptido señal predicho para la proteína (*SignalP3.0*). Se muestran sombreados en rojo los dominios reconocidos por la base de datos SMART con un valor *E* menor que los sombreados en naranja, y estos últimos con un menor valor *E* que los sombreados en gris. Los dominios sin sombreadar, no son reconocidos por SMART o CDART. Se muestra en verde la parte de proteína codificada por el exón 4. En el dominio LRR C-terminal (sombreado en azul), se señala con doble flecha un punto putativo de glicosilación predicho para la proteína. (Modificado de (Bermingham et al., 2006)).

Objetivos

Capítulo 2

Objetivos

Con esta tesis se pretende avanzar en el conocimiento de *LG11* como gen responsable de la aparición de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante, así como de sus genes parálogos *LG12*, *LG13* y *LG14*. Dicha línea de investigación comenzó en la *Unitat de Genètica Molecular*, dirigida por el Dr. Jordi Pérez-Tur, hace ya ocho años y fruto de ello, se han publicado varias tesis doctorales previas a la presente y varios artículos científicos. Dada la información de la que se dispone en este momento, y que ha sido presentada en la Introducción de la presente memoria, partimos de la hipótesis de que la distribución anatómica de la expresión de la familia de genes *LGI*, debe guardar una relación con su expresión, y en el caso específico de *LG11*, dicha distribución debe guardar relación con la aparición de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante. Y para validar dicha hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer el patrón de expresión de los transcritos de la familia génica *LGI* en cerebro de ratón adulto por medio de hibridación *in situ*, e inferir a partir de los resultados anteriores, las funciones en los que podrían estar implicados estos genes.
2. Determinar, por medio de técnicas de cultivo celular y biología molecular, el papel del dominio ETP en la secreción de la proteína *LG11*.

3. Determinar, por medio de técnicas de cultivo celular y biología molecular, si la proteína LGI1 actúa como ligando de un receptor de membrana específico.

Material y métodos

Capítulo 3

Material y métodos

3.1 Material biológico.

3.1.1 Cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli* DH 5 α (genotipo):** F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, λ ⁻. Se obtuvieron picando una colonia de *E. coli* DH 5 α que se creció durante el día en 1 mL de medio LB (1% bacto triptona, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura, pH 7). Tras ello se plaquearon 100 μ L del cultivo en sendas placas de LB-agar (1% bacto triptona, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura, pH 7, 2% agar) suplementadas con ampicilina a 100 mg/L en un caso, y kanamicina a 50 mg/L en el otro. El resto del cultivo se creció durante toda la noche en 40 mL de medio SOC (0,5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM SO₄Mg, 2 mM glucosa) para generar el inóculo. El día siguiente, tras comprobar que no habían crecido colonias en las placas, se inoculó 1 L de SOC con 10 mL del inóculo y se creció a 37 °C hasta llegar a una DO₅₉₅ de 0,5-0,6. Después se enfrió en hielo y se centrifugó a 4000 g durante 10 min a 4 °C, se lavó el sedimento de células con 1 L de agua milli-Q autoclavada y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió dos veces lavando con 0,5 L de agua milli-Q. El sedimento de células resultante se resuspendió en 20 mL de glicerol 10%

y se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 2-3 mL de glicerol 10% y se separó en alícuotas 40 µL en tubos que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se conservaron a -80 °C. El material utilizado en este protocolo se enfría previamente a -20 °C. Finalmente, se comprobó mediante siembra en placas de ampicilina y kanamicina que no existía crecimiento (bacterias contaminantes resistentes a antibióticos).

Todo el trabajo con bacterias se realizó en condiciones de asepsia, llevando a cabo la manipulación de reactivos, medios y material de cultivo bajo la llama de un mechero Bunsen. Asimismo, los medios de cultivo y reactivos se esterilizaron previamente en un autoclave a 121 °C y una atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos, o bien por filtración con un tamaño de poro de 0,22 µm para reactivos termosensibles.

3.1.2 Líneas celulares de mamífero.

- **HEK 293T:** Línea celular de riñón embrionario humano cedida por el Dr. Phil Barker (Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canadá). Se cultivan en medio básico DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen), con 10% de FBS (suero bovino fetal, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Invitrogen), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), y 0,1 mg/mL estreptomomicina a 37 °C y 5% de CO₂.

Todo el trabajo con líneas celulares de mamífero se realizó en condiciones de esterilidad en cuarto de cultivos con sistema de filtrado de aire en una cabina de flujo laminar vertical tipo II. Los medios de cultivo y reactivos se esterilizaron por filtración con un tamaño de poro de 0,22 µm cuando fue necesario.

3.1.3 Cepas de rata y ratón.

- Se emplearon crías de rata (P8-P10) de la cepa *Sprague-Dawley* (Charles River, n=80; peso=15-20 gr).
- Los ratones empleados fueron animales adultos de la cepa C57/BL6J (Harlan, n=20; peso=25-35 gr).

Los animales se mantuvieron a 22 °C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h:12 h y con acceso a agua y comida *ad libitum*. El cuidado y la manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo a las directrices del comité de ética de experimentación animal del CSIC y reduciendo en lo posible el número de animales empleados y su sufrimiento.

3.2 Construcciones.

3.2.1 Clonación direccional por subclonación o PCR.

Obtención de inserto (ORF a 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 restricción enzimática a partir de una digestión 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 de los enzimas de restricción incubando los 10 µg de DNA con, al menos, una unidad de cada

enzima en el tampón proporcionado por el fabricante a la temperatura adecuada durante más de dos horas. La totalidad de la reacción de digestión se visualiza en un gel de agarosa del 0,8-1% teñido con bromuro de etidio (Amresco), 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* (Qiagen) que permite concentrar la muestra eluyendo en 10 μ L.

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* (Stratagene) según las especificaciones del fabricante: 2,5 unidades de *Pfu Turbo* en tampón de reacción 1X, mezcla de los cuatro dNTPs 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 72 °C ajustando la duración de la extensión por ciclo según el tamaño del inserto (1 min/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* (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*, eluyendo en 10 μ L.

Obtención del vector destino.

El vector donde se desea 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'-P del vector se han de defosforilar para prevenir la religación del vector sin inserto. Para esto se incuba el vector digerido con cinco 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*.

Estimación de la cantidad de inserto y vector.

Ambos productos se cuantifican comparando la intensidad de banda al correr 1 μ L 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 Escala 1, Durviz).

Ligación y Electroporación.

La ligación del vector y del inserto digerido se lleva a cabo con el sistema *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) durante 15 minutos a Tª combinando vector e inserto en una relación molar de 1:3 en un volumen final de reacción de 21 μ L en presencia de los tampones

suministrados por el fabricante y una unidad de ligasa T4. Tras la ligación, el producto se purifica con el sistema *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) eluyendo la columna con 100 μ L de agua. Para su propagación y posterior purificación el producto de la ligación se transfiere a células electrocompetentes de *E. coli* DH 5 α mediante electroporación a 1700 mV con 10 μ L 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.

Se inocularon algunas colonias individuales crecidas en las placas con el antibiótico de selección 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 plasmídico en función de las necesidades de cada experimento: a media escala *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* o a gran escala *GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Megaprep*, ambos de la casa comercial Sigma.

3.2.2 Vectores de expresión utilizados.

- **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 en el laboratorio 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 (*Montréal Neurological Institute-McGill University*).
 - Marcador de selección en bacterias: ampicilina.
- **pBluescript II KS- (Stratagene)**: Vector de clonación válido para la transcripción de sondas de RNA *in vitro* gracias a que cuenta con un promotor T3 y un promotor T7 flanqueando el sitio de clonación múltiple (*polylinker*).
 - Marcador de selección en bacterias: ampicilina.

3.2.3 Cebadores utilizados.

Todos los cebadores utilizados se detallan a continuación. En los protocolos específicos que lo requieran, se hará referencia al número asignado a cada cebador en la tabla 4.

▣ **Tabla 4.** Cebadores empleados en la realización de este trabajo.

Nº	Nombre	Secuencia 5' — 3'
#1	meLGI1-a-X3F	TTGG GTCGACT GCAGCTCTTGTTATTACG
#2	meLGI1-a-X7R	CTTG CTCGAGT CTCTACGTGGTCCCATT
#3	meLGI1-b-X8F	TAGAG GTCGACC AGGCACCCAGATCATT
#4	meLGI1-b-X8R	AGCA CTCGAG ATCAACAGGAATCAAACAGC
#5	meLGI2-a-X7F	CTAT GAATTC GAAATCTATGTGCAGGCG
#6	meLGI2-a-X7R	CTAT CTCGAGT TTTCAGCTCACTTTGGC
#7	meLGI2-b-X6F	CTAT GAATTC CATGGTGTGGAGTGGGAC
#8	meLGI2-b-X7R	CTAT CTCGAG GAAACGGGTGAGGGAAAG
#9	meLGI3-a-X1F	CTAT GAATTC CAGTGCCAAGAGACCTCC
#10	meLGI3-a-X6R	CTAT CTCGAG CTGCACCTTGTTCTG
#11	meLGI3-b-X8F	CTAT GAATTC TTCAAGGGACAAACTGG
#12	meLGI3-b-X8R	CTAT CTCGAG CCATCAGTGTCCACAGGTG
#13	meLGI4-a-X5F	CTAT GAATTC CCTCATGTGGACCTCCGTG
#14	meLGI4-a-X8R	CTAT CTCGAG ATCAGCCACCACGAAGC
#15	meLGI4-b-X9F	CTAT GAATTC GAAAGACCCTGGAAGTGG
#16	meLGI4-b-X9R	CTAT CTCGAG ACGCGTAAAAGCATTAG
#17	heLGI1- <i>Xho</i> I-F	ATTTAA CTCGAG GGAAGGAGATAGAACCATGGAAATCAG AAAGAAGC
#18	heLGI1-0EPTPs- <i>Eco</i> RI	GTACAAG GAATTC TAATGATGCAATCGAAATCC
#19	heLGI1-1EPTPs- <i>Eco</i> RI	TTAATC GAATTC CATGGTCCCATTCAAGG
#20	heLGI1-2EPTPs- <i>Eco</i> RI	GATCCT GAATTC CAAACTGTCTCGTTATAG
#21	heLGI1-3EPTPs- <i>Eco</i> RI	CACTCC GAATTC CGTTCCGTTCCATT
#22	heLGI1-4EPTPs- <i>Eco</i> RI	TCACAT GAATTC CTTTGTTCCACTGATAAATT
#23	heLGI1-5EPTPs- <i>Eco</i> RI	ATTTAAG GAATTC TGCCTCCCCATTTCAT
#24	heLGI1-6EPTPs- <i>Eco</i> RI	ATTTAAG GAATTC CTGCATCCCAGTTATACAC
#25	heLGI1- <i>Eco</i> RI-no PSAP-F	ACTTAG GAATTC AGAAACCAGCCAAGCCAAAATGC
#26	heLGI1- <i>Xho</i> I-STOP-R	ATATC CTCGAGT CATGCGCTTAGTCAACTATGAC

Nº: Número de referencia del cebador a efectos de citación en el texto. Se encuentran subrayados los codones de inicio (ATG) de las proteínas resultantes. Se resaltan en negrita los sitios de restricción.

3.3 Expresión de proteínas en células de mamífero.

3.3.1 Métodos de transfección.

Las células HEK 293T empleadas se transfectaron mediante el método de fosfato cálcico.

Transfección por el método del fosfato cálcico.

El día anterior a la transfección se sembraron $1,3 \cdot 10^6$ células HEK 293T por placa de cultivo de 10 cm de diámetro (Sarstedt), una por cada reacción de transfección que se pretendía 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 se añadieron gota a gota 600 µL de tampón HBS 2X (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 50 mM HEPES, pH 7,05) y sobre esto 60 µL, también gota a gota, de 2M CaCl₂. Tras 20 min de incubación a TªA durante el que se forman los precipitados de fosfato cálcico, se mezcló cuidadosamente el contenido del tubo con la pipeta y se distribuyó gota a gota sobre la placa de cultivo. Las células se incubaron durante 8-24 horas 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, 24 horas tras el cambio de medio era suficiente para encontrar niveles detectables de proteína.

3.4 Procesado y detección de proteínas en células de mamíferos.

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.

3.4.1 Procesado de medios 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 μm , 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 SB 2X (0,3 M Tris-HCl a pH 6,8, 5% SDS, 50% glicerol, 5% β -mercaptoetanol y 0,2 mg/mL azul de bromofenol) y los medios se analizaron por SDS-PAGE.

3.4.2 Procesado de lisados celulares.

Para la obtención del lisado celular, se llevó a cabo primero un lavado de la placa con PBS+ a 4 °C (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+ a 4 °C 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 g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se pasaron a un tubo limpio. Para analizar la expresión por *Western blot* se tomaron 50 µL de cada lisado combinado con 50 µL de tampón de carga SB 2X.

3.4.3 Inmunoprecipitación.

En todos los experimentos se utilizó la misma estrategia para comprobar interacciones; expresamos la proteína de interés con etiqueta Flag, inmunoprecipitando la proteína con Flag con un anticuerpo policlonal anti-Flag (Sigma), detectando después la proteína fusionada a esa etiqueta mediante un anticuerpo anti-Flag generado en una especie distinta.

Catorce horas después de la transfección, se cambió el medio a las células HEK 293T por medio completo (DMEM, 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomycin, 0,1 mg/mL G418). 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-G sepharosa (GE Life Sciences). Para cada reacción de inmunoprecipitación se mezclaron 50 µL de suspensión de bolas de proteína-G (preequilibradas en tampón NP40), 5 µL 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 descrito en

3.4.2. 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 preparada el día anterior, a 1500 g durante 45 s. Se retiró el máximo tampón posible sin arrastrar bolas y se completó con tampón NP40 hasta llegar al volumen de partida. Se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió un par de veces. Tras retirar el sobrenadante del último lavado, se añadió un volumen de tampón que nos permitió repartir la suspensión en alícuotas de 50 μ L en tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL (previamente rotulados). Tras el último lavado, se centrifugaron los tubos tipo Eppendorf y se retiró parte del tampón, dejando las bolas sepharosa-G en un volumen final aproximado de 100 μ L.

Se mezclaron 50 μ L de cada lisado con 50 μ L de SB 2X. 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 dos horas a 4 °C y en agitación rotatoria.

Tras las dos horas se hicieron dos lavados con tampón NP40 atemperado a 4 °C y no suplementado. Para hacer los lavados primero se centrifugaron las muestras a 4 °C y a 1500 rpm durante 1 min. Se aspiró el máximo tampón posible sin arrastrar bolas y se añadió 1 mL 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 SB 2X 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 desnaturalizantes.

3.4.4 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 desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa para la detección con anticuerpos (*Western blot*). A continuación se detalla el protocolo general utilizado para estas técnicas.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (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 al 0,1%, TEMED al 0,08% (N, N, N', N'-tetrametilendiamina) (Genaxis) y SDS al 10%, que consigue una carga negativa uniforme en las proteínas desnaturalizadas 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 desnaturalizó durante 10 min a 100 °C justo antes de someterse a la electroforesis que se realizó en tampón de Laemmli (Tris 3,03% (p/v) y glicina 14,4% (p/v), 0,1% SDS (p/v), pH 8,3), que se preparó concentrado 10 veces 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).

Las condiciones empleadas durante la electroforesis fueron de 90 V durante 30 minutos seguidas de 100 V durante 90 minutos. Se utilizó una fuente de alimentación Power Pac 300 de Bio Rad.

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 GE Life Sciences) en tampón de transferencia (20mM Tris, 150 mM glicina y metanol 20% (v/v)).

Las proteínas se electrotransfirieron a las membranas a 60 V y 300 mA y 4 °C durante una hora, empleando un equipo de transferencia de Bio Rad. Entre los electrodos de carbón del equipo se colocaron dos papeles 3MM de Whatman (Maidstone) empapados en tampón de transferencia, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otros dos 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 TBST (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 TBST y se bloqueó con tampón de bloqueo (5% (p/v) leche descremada en TBST) 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 dos horas a temperatura ambiente o 16 h a 4 °C. Tras lavar la membrana varias veces con TBST, se incubó con anticuerpos secundarios policlonales conjugados a HRP (a una dilución 1:5000 (v/v) en todos los casos) durante 1h 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana con TBST, se realizó el revelado con una solución de ECL o ECL Plus (GE Life Sciences) cuando se requería de una mayor sensibilidad.

En la tabla 5 se especifican los distintos anticuerpos empleados, la especie en que fueron generados, la dilución de uso y la casa comercial a la que pertenecen.

▣ **Tabla 5.** 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	Molecular probes
Secundarios			
anti-ratón ^{HRP1}	Burro	1:5000	Jackson
anti-conejo ^{HRP1}	Burro	1:500	Jackson

¹ **HRP:** Peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*).

3.5 Ensayos de unión a la superficie celular (AP binding).

Esta metodología descrita por Flanagan y colaboradores (Flanagan and Cheng, 2000) 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 (construcción generada a partir de los cebadores #25 y #26) era capaz de unirse a la superficie de neuronas granulares de cerebelo (CGN).

3.5.1 Producción de 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. Con esta técnica se puede conseguir un medio enriquecido en una determinada proteína transfectando el cultivo con una construcción que contenga una proteína con capacidad para ser secretada por la célula. Como la transfección supone una sobreexpresión de la proteína exógena introducida, el medio condicionado resultante se encuentra eminentemente enriquecido con esa proteína, aunque también se acumulan en el medio factores secretados por el metabolismo normal de las células en cultivo.

En estos ensayos se utilizaron células HEK 293T para producir medios condicionados enriquecidos en AP-LGI1 y AP (células transfectadas con pc3.1AP6 sin inserto).

Para ello se transfectaron células HEK 293T en medio completo por el método del fosfato cálcico con 10 µg del plásmido correspondiente (5 µg en el caso de pc3.1AP6 sin inserto). A las 16 h se cambió

el medio a medio completo, dejándolas crecer hasta alcanzar un 90-100% de confluencia (normalmente hasta el día siguiente). En ese momento, se hizo un lavado con 5 mL de medio DMEM sin suero (DMEM, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomina, 1mM aminoácidos no esenciales) para retirar todo el suero posible, y se incubaron las células durante 48 horas en 10 mL del mismo medio sin suero.

Pasados los dos días, se recogió todo el medio y se desecharon las placas. Antes de concentrarlo se eliminaron los restos celulares primero por centrifugación 20 min a 3500 g a 4 °C y luego por filtración a través de un poro de 0,45 µm. Una vez filtrados, los medios se concentraron en unidades de filtración Amicon Ultra YM-30 (Millipore) a 3220 g. Los medios se concentraron entre 10 y 30 veces según el experimento. 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 el momento de su uso.

La concentración de proteína existente en los medios AP y AP-LG11 se estimó como se describe en: Flanagan and Cheng, 2000; Flanagan et al., 2000. Esto es, midiendo la actividad AP presente en el medio mediante el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma) que se convierte en un producto de color amarillo cuya absorbancia puede medirse a 405 nm. A partir del incremento de A_{405}/min en 5 µL de medio concentrado con 50 µL de sustrato pNPP y parando la reacción con 100 µL de 1 N NaOH se puede estimar la concentración de AP o AP-LG11.

3.5.2 Ensayos con neuronas granulares de cerebelo (CGN).

Obtención de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata.

Para la obtención de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo se utilizaron ratas de la cepa *Sprague-Dawley* con edades comprendidas entre P8 y P10. En realidad mediante este protocolo no se consiguen cultivos puros de neuronas granulares ya que lo que se hace es disgregar mecánica y enzimáticamente el cerebelo y sembrar las células obtenidas, a pesar de esto, se consiguen cultivos en los que la población de neuronas mayoritaria corresponde a neuronas granulares.

Tras la disección de los cerebelos de los animales, éstos fueron depositados en tampón de disección HHGN (1X *Hank's Balanced Salt Solution* (HyClone), 35 mM glucosa, 2,5 mM HEPES pH 7,4) mientras se retiraban por completo las meninges y se troceaban con una cuchilla. Tras ello se pasaron a un tubo de 15 mL tipo Falcon y se centrifugaron 1 min a 500 g para eliminar el sobrenadante y sustituirlo por 3 mL de tripsina al 0,25% (Gibco) en HHGN, incubándose en esta solución durante 10 min a 37 °C. Inmediatamente después se añadieron 5 mL de medio Sato (DMEM, suplementado con 1X N2 (100X Gibco), 10% FBS (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina, L-tiroxina 0,1 µg/mL (Sigma), triyodo-tironina 0,08 µg/mL (Sigma)). Tras ello se centrifugaron las células (2 min a 500 g), se retiró el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en 1 mL de medio Sato. Con el fin de disgregarlas completamente se trituró la suspensión de células pasándola por agujas de diámetro decreciente (8 veces con aguja 20 G y 2 veces por aguja 22 G). Tras ello, se centrifugó la suspensión de células durante 10 minutos a 500 g. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de medio Sato, tras lo

cual se hizo un recuento celular y se plaquearon $1 \cdot 10^6$ células por pocillo en placas de 12 pocillos tratadas previamente durante 1 hora con 0,01% Poli-L-Lisina (Sigma). Las células se mantuvieron en incubador a 37 °C en presencia de 5% de CO₂ a la espera de ensayos posteriores.

Ensayos de unión a superficie celular de CGN.

A las 24 h de la obtención de los cultivos primarios de CGN, se procedió a la retirada del medio de cultivo y lavado con HBSS a T^aA. Tras ello, se incubaron las células en un volumen final de 2 mL de medio DMEB (DMEM suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1%) por pocillo de 3,8 cm², con una concentración final de AP-LGI1 o de AP de 22 nM durante 1 h 30 min a T^aA. Pasados los 90 minutos, se lavaron las placas tres veces con solución HBAH muy fría (Hanks Balanced SALT Solution, 20 mM HEPES, 0,1% azida sódica y 0,5 mg/mL BSA). A continuación, se añadieron 2 mL de tampón HBS 1X por pocillo y para inactivar la actividad endógena de la fosfatasa alcalina, se incubaron las muestras a 65 °C durante 90 minutos en condiciones de humedad.

El revelado se efectuó añadiendo 1 mL del sustrato NBT (*nitro blue tetrazolium*, 0,33 mg/mL) y BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, 0,17 mg/mL) (Sigma) en tampón de detección AP (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,5). Este reactivo es sensible a la luz, de manera que el revelado se llevó a cabo en oscuridad y a temperatura ambiente. En presencia de actividad AP, el sustrato forma un precipitado de color azul-morado que se queda adherido a las células. El revelado se paró lavando las muestras con PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2 mM KH₂PO₄) suplementado con 10 mM EDTA. Las microfotografías se obtuvieron en un microscopio Zeiss Axiovert 25 (Zeiss).

3.6 Hibridación *in situ* de cerebro de ratón.

Para el análisis de expresión de ARNm de los genes *LG11*, *LG12*, *LG13* y *LG14*, se realizó hibridación *in situ* sobre cortes de cerebro de ratón adulto. Durante todos los protocolos de trabajo relacionados con la síntesis y manipulación de ARN se tomó especial precaución con el fin de evitar la degradación de ARN por ARNasas: todas las soluciones se trataron con dietilpírocarbonato (DEPC, Sigma) al 0,1% durante toda la noche a TªA, tras lo cual se autoclavaron para inactivar dicho producto. Las soluciones no autoclavables, se prepararon con agua tratada con DEPC. Todo el material de metal y de vidrio fue asimismo limpiado con etanol y tratado a 200 °C durante dos horas.

3.6.1 Diseño y síntesis de ribosondas.

Con el propósito de confirmar la fiabilidad de los resultados, se diseñaron dos sondas antisentido distintas, ambas complementarias al ARNm de ratón correspondiente a cada uno de los genes a estudiar. Las secuencias escogidas se amplificaron por PCR a partir de una genoteca de cDNA de ratón (Invitrogen) para posteriormente clonaras en el vector pBluescript II KS-. Los cebadores empleados en la amplificación de las secuencias correspondientes a las sondas, son los #9 a #24 de la tabla 4. En la tabla 6 se especifican las secuencias utilizadas para la síntesis de las sondas, así como los enzimas de restricción empleados en su clonación, que se llevó a cabo según el apartado 3.2 de la presente memoria.

▣ **Tabla 6.** Características de las ribosondas utilizadas.

Sonda	Secuencia ref.	Extensión	Exón	Cebadores utilizados
LGI1a	NM_020278	379-909	X3-X7	#1 y #2
LGI1b		1659-2174	X8-3'UTR	#3 y #4
LGI2a	NM_144945	1700-2343	3'UTR	#5 y #6
LGI2b		952-1507	X6-X7	#7 y #8
LGI3a	NM_145219	280-823	X1-X6	#9 y #10
LGI3b		1790-2344	3'UTR	#11 y #12
LGI4a	NM_144556	538-1091	X5-X8	#13 y #14
LGI4b ²		1707-2252	3'UTR	#15 y #16

Una vez clonadas, las construcciones fueron amplificadas en bacteria y tras una purificación con fenol, se procedió a la síntesis *in vitro* de las sondas de ARN marcadas con digoxigenina mediante el sistema comercial *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la síntesis, se comprobó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE y se diluyeron en formamida al 50% de concentración final para prevenir la formación de estructuras secundarias. Las sondas se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.6.2 Obtención de polvo de cerebro.

El polvo de cerebro se obtiene homogenizando varios cerebros de ratón en 0,1 M PBS, y tras centrifugar a 3000 g durante 30 minutos, se lava el pellet con acetona, se deja secar y se machaca en mortero hasta conseguir un polvo fino. Dicho polvo se utiliza como

² En el diseño de esta sonda se tuvo en cuenta que la región 3' del gen *LGI4* coincide con la región también 3' del gen *Fxyd3*, que se transcribe en sentido contrario. Para eliminar la posibilidad de inespecificidades, se evitó la zona de coincidencia de ambos genes en la secuencia de la sonda.

inhibidor de reacciones cruzadas durante el protocolo de hibridación *in situ*.

3.6.3 Obtención de cortes e hibridación *in situ*.

Todos los tratamientos posteriores a la extracción del cerebro fueron realizados a 4 °C a menos que se especifique lo contrario.

Los cerebros utilizados para los experimentos de hibridación *in situ* fueron extraídos de ratones adultos, que fueron sacrificados por luxación subcervical. Tras ser extraídos, los cerebros se lavaron en PBS (0,1 M) y se fijaron durante toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. Al día siguiente se lavaron durante 30 minutos en PBS para eliminar el fijador y se incluyeron en gelatina para proceder a su corte en secciones de 50 µm al vibratomo, que previamente se limpió convenientemente con agua tratada con DEPC y jabón. En el momento de seccionar, se obtuvieron cuatro subseries paralelas de cada uno de los cerebros utilizados. Cada subserie se incubó con una de las sondas utilizadas (dos sondas sentido y dos sondas antisentido para cada gen *LGI*). Una vez seccionados, los cerebros se mantuvieron en placas con PFA al 4% hasta el momento de comenzar con el protocolo de hibridación *in situ*. Éste comenzó con dos lavados en PBST (0,1% Tween 20 en 0,1 M PBS) y la deshidratación gradual de los cortes en metanol diluido en PBST al 25%, 50%, 75%, 100% y rehidratación a la inversa. Posteriormente los cortes se lavaron tres veces en PBST y se blanquearon con H₂O₂ al 1% en PBST durante 10 minutos, tras lo cual se lavaron de nuevo con PBST y se trataron con proteinasa K 5 µg/mL durante 7 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se lavaron en PBST de nuevo y se realizó una postfijación con PFA al 4% en PBST. Se volvieron a lavar de nuevo con PBST y tras prehibridar durante al menos dos horas, los cortes en solución de hibridación (50% Formamida desionizada, 5X SSC, 2% Blocking powder

(Roche), 0,1% Tritón X-100, 1 mg/mL ARN de levadura, 5 mM EDTA, 50 µg/mL heparina) a 57 °C, se añadió la sonda a una concentración de 1 µg/mL y se dejó hibridando toda la noche también a 57 °C en agitación suave. Al día siguiente se hicieron cinco lavados de 30 minutos con 0,1% CHAPS, 2X SSC en H₂O DEPC a 57 °C y tras bloquear durante 3 horas con suero bovino fetal al 20% en KTBT (150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,3% Tritón X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) se procedió a la incubación con el anticuerpo anti-DIG (Roche), que fue previamente preabsorbido con polvo de cerebro, durante toda la noche a una dilución 1:1000. Al día siguiente se hicieron cinco lavados de 30 minutos de duración con KTBT a temperatura ambiente y se revelaron los cortes con una solución compuesta por 0,33 mg/mL NBT, 0,17 mg/mL BCIP en tampón NTMT (50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 100 mM Tris-HCl pH 9,5) durante varias horas también a temperatura ambiente hasta la aparición de la intensidad de señal deseada, tras lo cual se detuvo la reacción lavando varias veces con KTBT y finalmente con PBS hasta el montaje de los cortes. Dicho montaje se llevó a cabo sobre portas superfrost/plus (Micom), tras el cual, los cortes se deshidrataron, se aclararon con xileno y se cubrieron medio Eukitt (Zeiss).

Para evitar posibles hibridaciones no específicas, durante todo el proceso, se ensayaron controles para todas las sondas antisentido utilizadas, incubando paralelamente la respectiva sonda sentido a la misma concentración.

3.6.4 Análisis de la distribución anatómica de los transcritos de la familia *LGI*.

Cada una de las series de secciones obtenidas tras la hibridación *in situ* fue analizada con un microscopio Nikon Eclipse E600 a 4x, 10x y 20x aumentos con iluminación de campo claro. Cada

sección fue comparada con el nivel correspondiente del atlas anatómico de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001), del cual se obtuvieron un conjunto de diagramas para la representación de la expresión de los genes *LGI* (figura 11). Dicha serie de diagramas, contiene representaciones del cerebro de ratón desde el nivel Bregma +3,08 mm (A1-A4) hasta el nivel más caudal Bregma -7,64 mm (S1-S4). Los diagramas consecutivos corresponden a una separación de 0,5 mm y los puntos rojos, representan marcaje en el área señalada, siguiendo nuestra propia apreciación subjetiva a la hora de cuantificar el nivel de expresión. Además, los niveles de expresión fueron también analizados para las áreas más representativas bajo nuestro propio criterio para la elaboración de la tabla que aparece en el tabla 8 de la presente memoria.

Las microfotografías obtenidas para mostrar las zonas con marcaje de cada uno de los cuatro transcritos marcados, fueron obtenidas en campo claro usando una cámara Nikon DMX-1200 conectada a un ordenador. Dichas imágenes se capturaron usando el software ACT1 (Nikon) y se ajustó su brillo y contraste usando el programa Adobe Photoshop.

3.7 Determinación del tipo celular de expresión de un gen.

Con el objetivo de determinar el tipo celular en el cual se expresaban algunos de los genes estudiados por hibridación *in situ*, se llevó a cabo una detección inmunohistoquímica que ayudase a determinar la naturaleza de las células que habían sido marcadas previamente por expresar ARNm de alguno de los genes estudiados. A continuación se describen las técnicas llevadas a cabo con ese propósito.

3.7.1 Microinyección de *fluorogold* en hipocampo de cerebro de ratón.

Una de las aproximaciones utilizadas para determinar la naturaleza química de determinados grupos celulares, fue la microinyección del trazador retrógrado *fluorogold* en hipocampo de cerebro de ratón, que posteriormente fue detectado inmunohistoquímicamente tal y como se describe en el protocolo siguiente. Para dicha microinyección, se disolvió *fluorogold* al 4% en agua milli-Q. Para su inyección en el hipocampo, se utilizaron micropipetas de 50 μm de diametro de punta, que se llenaron con la solución trazadora. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Imalgene 500) y xilacina (Xilagesic). Una vez anestesiados, los ratones fueron colocados en el cuadro estereotáxico adaptado para ratón de Narishige. En caso necesario, se suministró anestesia adicional de isofluorano a través de un vaporizador adaptado a la pinza del hocico del ratón. A continuación, se practicó una incisión longitudinal y un trépano del hueso parietal a nivel de las coordenadas de inyección. Una vez descubierta y cortada la meninge, la micropipeta fue introducida en el hipocampo en las coordenadas antero-posterior -2,5 mm, medio-lateral 2,5 mm, dorso-ventral -3 mm respecto a Bregma. Una vez en el lugar, se realizaron dos inyecciones con una bomba neumática (Picospitzer IM300) de Narishige. Tras la inyección se dejó la micropipeta en el lugar por 10 minutos, tras lo cual se sacó, se suturó la herida y se dejó recuperar al animal.

Tras siete días de supervivencia los animales fueron anestesiados de nuevo con nembutal (Eutalender 150 mg/Kg) y sacrificados mediante perfusión de solución salina, seguida de fijador que contenía paraformaldehído al 4% en tampón PBS 0,1 M pH 7,4. Posteriormente fueron incubados durante toda la noche en paraformaldehído al 4% en tampón 0,1 M PBS y al día siguiente se cortaron con vibratomo

a 50 μm y procesados para dobles marcajes tal y como se describe a continuación.

3.7.2 Inmunohistoquímica.

Como material de partida se utilizaron cortes de cerebro de ratón sobre los que previamente se había realizado hibridación *in situ*, tal y como se ha descrito en el anterior apartado. Sobre estos cortes, se realizó un lavado durante toda la noche en TBS-Tx (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100). Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tx y se procesaron los cortes para inmunohistoquímica. Todas las incubaciones de este protocolo se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. Se bloquearon los antígenos inespecíficos con solución de bloqueo durante 2 h (4% normal donkey serum y 2% albúmina de suero bovino en TBS-Tx). Una vez acabado este bloqueo de uniones inespecíficas, los cortes se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario de interés, a la dilución correspondiente en solución de bloqueo (ver tabla 7). Para eliminar el anticuerpo no unido, se lavaron los cortes con TBS-Tx tres veces durante 10 minutos cada lavado. Tras ello, se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina y diluido en TBS-Tx (tabla 7). Tras esta incubación, se volvieron a lavar los cortes tres veces durante 10 minutos con TBS-Tx antes de incubar con complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) del kit de la casa comercial Vectastain elite ABC (Vectorlabs) según las instrucciones del fabricante, diluyéndolos 1:300 en TBS-Tx durante 2 h. Antes del revelado, se lavaron los cortes tres veces durante 10 minutos con 0,05 M Tris-HCl pH 7,6. Para el revelado, se incubaron los cortes con 0,05% diaminobenzidina (DAB) y 0,01% H_2O_2 en 0,05 M Tris-HCl pH 7,6 hasta ver aparecer la intensidad de señal deseada. La reacción se detuvo eliminando el DAB mediante tres lavados con 0,05 M Tris-HCl

pH 7,6. Para la observación de los cortes, éstos se montaron sobre portaobjetos, tras lo cual se los sometió a un proceso de deshidratación en alcoholes de concentración creciente (70%, 96% y dos veces en 100%) y un paso final en xilol. Como medio de montaje se utilizó Eukitt (Zeiss). La observación y toma de microfotografías se realizó tal y como se describe en el apartado anterior para los cortes sometidos a hibridación *in situ*.

▣ **Tabla 7.** Anticuerpos usados en los ensayos de inmunohistoquímica sobre cortes de cerebro de ratón.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa Comercial
Primarios			
anti-parvalbumina	Ratón	1:10000	Swant
Anti-GABA ³	Conejo	1:1000	Sigma
anti- <i>fluorogold</i>	Conejo	1:2000	Chemicon
Secundarios			
anti-ratón	Burro	1:200	Jackson
anti-conejo	Burro	1:200	Jackson

³ Las muestras que se incubaron con anticuerpo anti-GABA fueron lavadas durante todo el procesado con TBS (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) en lugar de TBS-Tx.

Resultados

Capítulo 4

Resultados

4.1 Expresión de los ARNm de la familia *LGI*.

En este estudio, se usó hibridación *in situ* para determinar la distribución anatómica de las células o grupos de células que expresaban transcritos de la familia génica *LGI*, *LGI1*, 2, 3 y 4, en el cerebro del ratón adulto. Para ello, se diseñaron y sintetizaron dos sondas antisentido de ARN, marcadas con digoxigenina para cada uno de los genes mencionados. Con el fin de asegurar la especificidad de la unión de las sondas utilizadas a sus transcritos correspondientes, también se usaron sus respectivas sondas sentido, verificando para cada una de ellas que la sonda sentido no producía marcaje (figura 12A para la sonda sentido *LGI1a*), y que las dos sondas antisentido correspondientes a cada gen, daban lugar a un marcaje idéntico, sin diferencias en cuanto a lugar de marcaje, ni su intensidad relativa.

Para facilitar la comparación de los patrones de expresión de los distintos genes, se elaboró una tabla resumen con los niveles relativos de expresión en las zonas más representativas del cerebro para cada gen (tabla 8). Además, se confeccionaron un conjunto de representaciones esquemáticas de las distintas zonas del cerebro, basadas en láminas del atlas "*The mouse brain in stereotaxic coordinates*", de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). En ellas se representa la expresión observada de cada uno de los genes *LGI* en el cerebro (figura 11). La cuantificación de la expresión responde a nuestros propios criterios subjetivos.

📄 **Tabla 8.** Niveles relativos de expresión de los genes *LG11-4* en cerebro de ratón.

Zona del cerebro y tipo celular	<i>LG11</i>	<i>LG12</i>	<i>LG13</i>	<i>LG14</i>
(I) Telencéfalo				
Bulbo olfatorio				
Capa glomerular				
Capa mitral			++	
Capa granular	+	+		++
Bulbo olfatorio accesorio				
Capa glomerular				
Capa mitral				
Capa granular		+	+	++
Núcleos olfatorios anteriores		++		
Córtex cerebral	+	+	+	+
Córtex piriforme	++			+++
Formación hipocampal				
Cuerno de Ammon	++++	+	+++	+
Giro dentado	++++	+	++++	+
Área septal				
Núcleo septal medial		+++		++
Núcleo septal lateral	+			
Septum posterior		++		
Amígdala				
Lateral	++	++	+++	+
Cortical				++
Núcleos basales	+			+
Medial		+	+++	
Central	+	+		+
Núcleo de la estría terminal		++		++
Pálido ventral		++		++
<i>Globus pallidus</i>		+++	+++	+
<i>Caudatus putamen</i>		++	+	+
Núcleo accumbens	+	+		+

Zona del cerebro y tipo celular	LG11	LG12	LG13	LG14
(II) Diencefalo				
Tálamo				
Núcleos anteriores		++	++	
Núcleos dorsales			++	
Núcleos ventrales			++	
Núcleos mediodorsales			++	
Núcleos posteriores			++	
Núcleos intralaminares		+	++	
Núcleo geniculado medial		++	++	++
Núcleo geniculado lateral			+++	
Núcleo reticular		++++	++	++++
Subtálamo				
Zona <i>incerta</i>		++	++	++
Complejo habenular				
Núcleo medial			+	+
Núcleo lateral			+	++
Hipotálamo				
Núcleo supraóptico			+	
Núcleo paraventricular			+	
Núcleo ventromedial			+	
Área mamilar			+	++
(III) Mesencéfalo				
Área ventral tegmental		++	+++	++++
<i>Substantia nigra</i>				
<i>Pars compacta</i>		++	+++	++++
<i>Pars reticulata</i>		++	++	++
Núcleo rojo		++	+++	
Central gray matter			+++	
Núcleo interpeduncular		++		++
Núcleo intercolicular		++		++
Sistema visual				
Área pretectal				+

Zona del cerebro y tipo celular	LG11	LG12	LG13	LG14
Colículo superior				
(IV) Puente y médula				
Sistema auditivo				
Colículo inferior				++
Núcleo coclear dorsal		+		++
Núcleo coclear ventral anterior				++
Núcleo coclear ventral posterior		+		+
Núcleos vestibulares				++
Sistema somatosensorial				
Núcleo trigeminal mesencefálico				
Núcleo trigeminal principal				+
Núcleo trigeminal espinal		+		+
Núcleo del tracto solitario			++	+
Sistema oculomotor				
Núcleo de Edinger-Westphal			+	
Núcleo oculomotor				+++
Formación reticular		+	++	
Núcleos del rafe				
Rafe dorsal				
Rafe mediano		++		
Rafe magno				
Rafe oscuro				
Oliva inferior		++		++
(V) Cerebelo				
Núcleos cerebelares		+	++	
Córtex				
Células de Purkinje		+	+++	
Células granulares		+++		+++
(VI) Médula espinal				
Asta dorsal				
Asta ventral			++	

Figura 11A

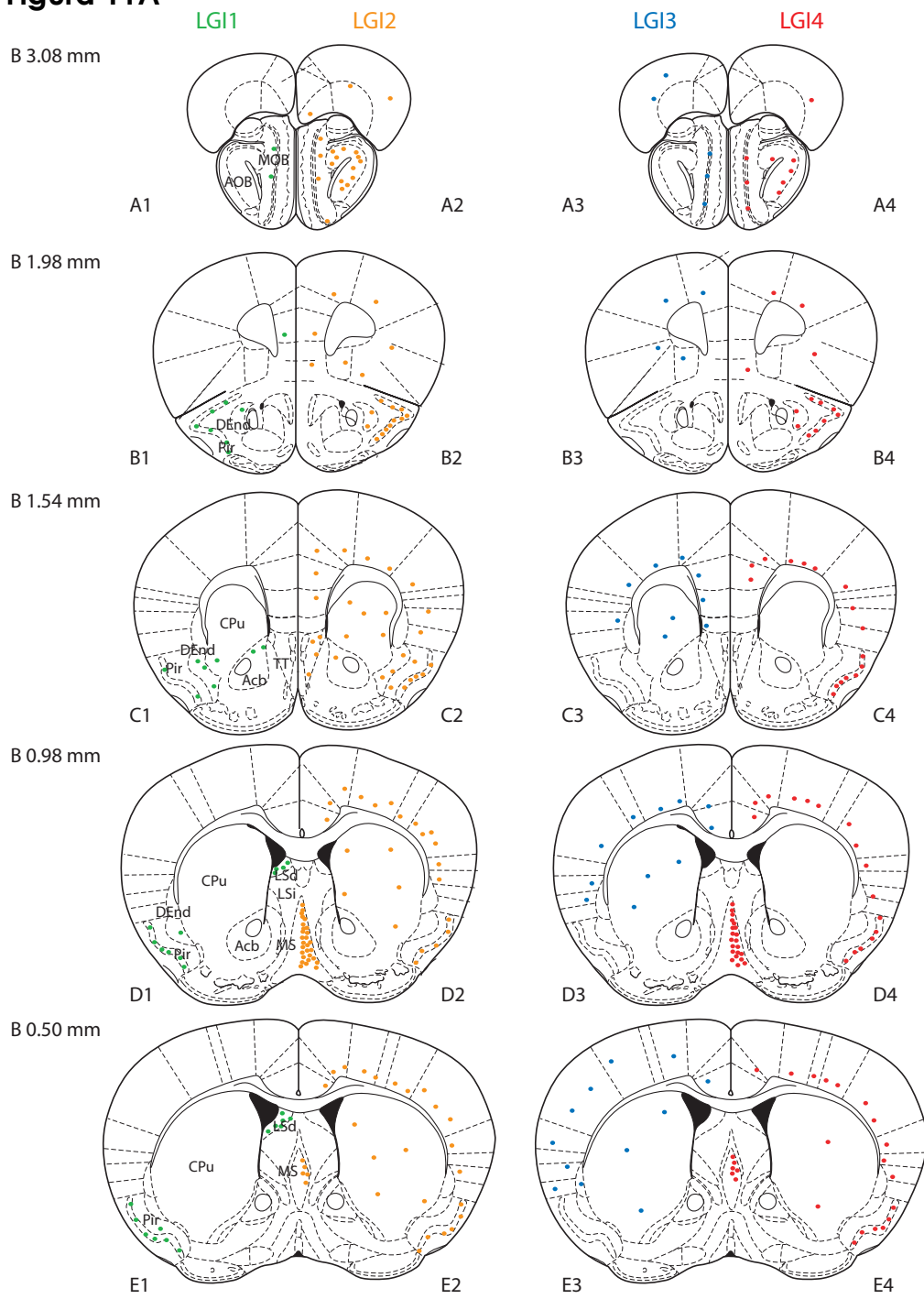
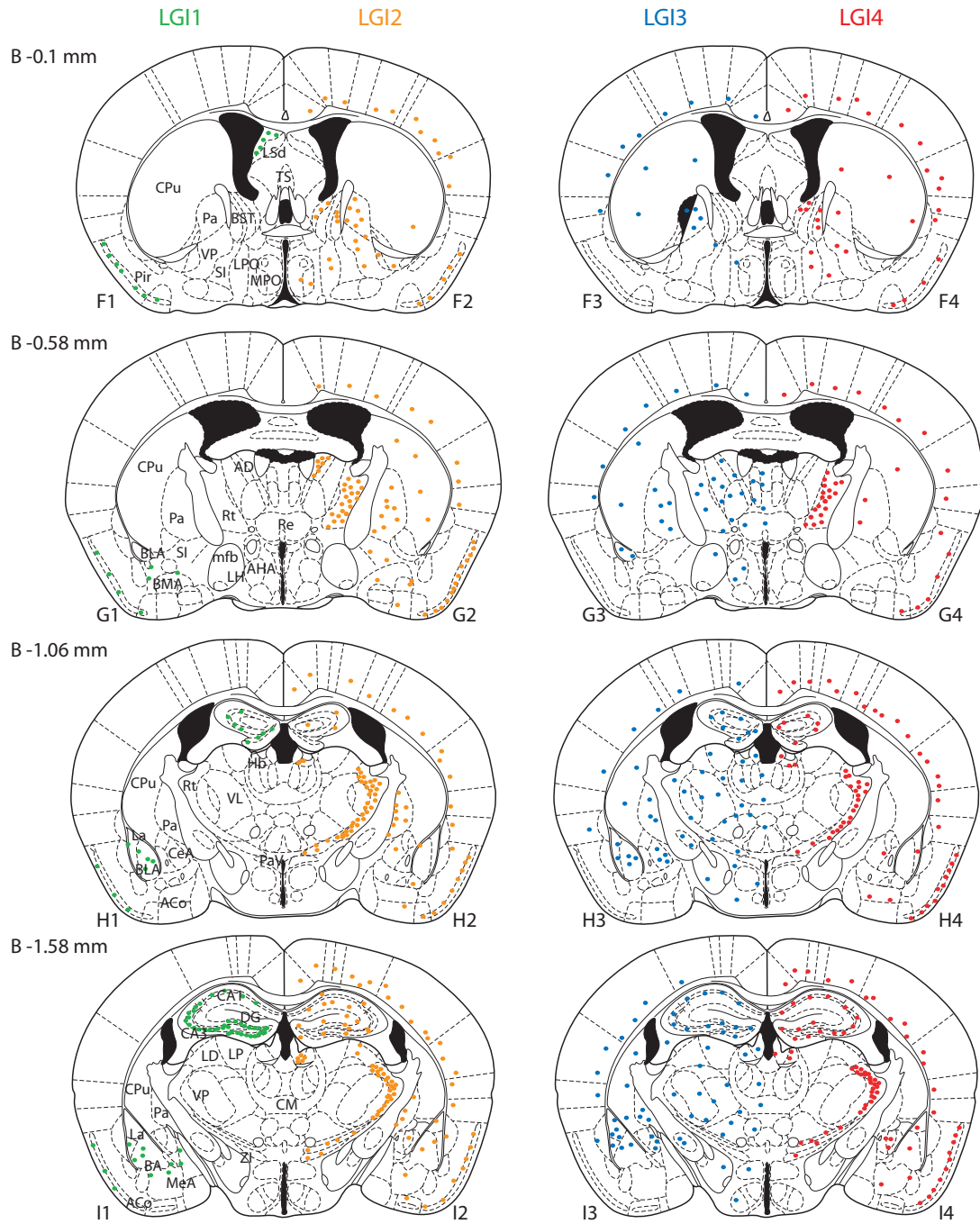


Figura 11B



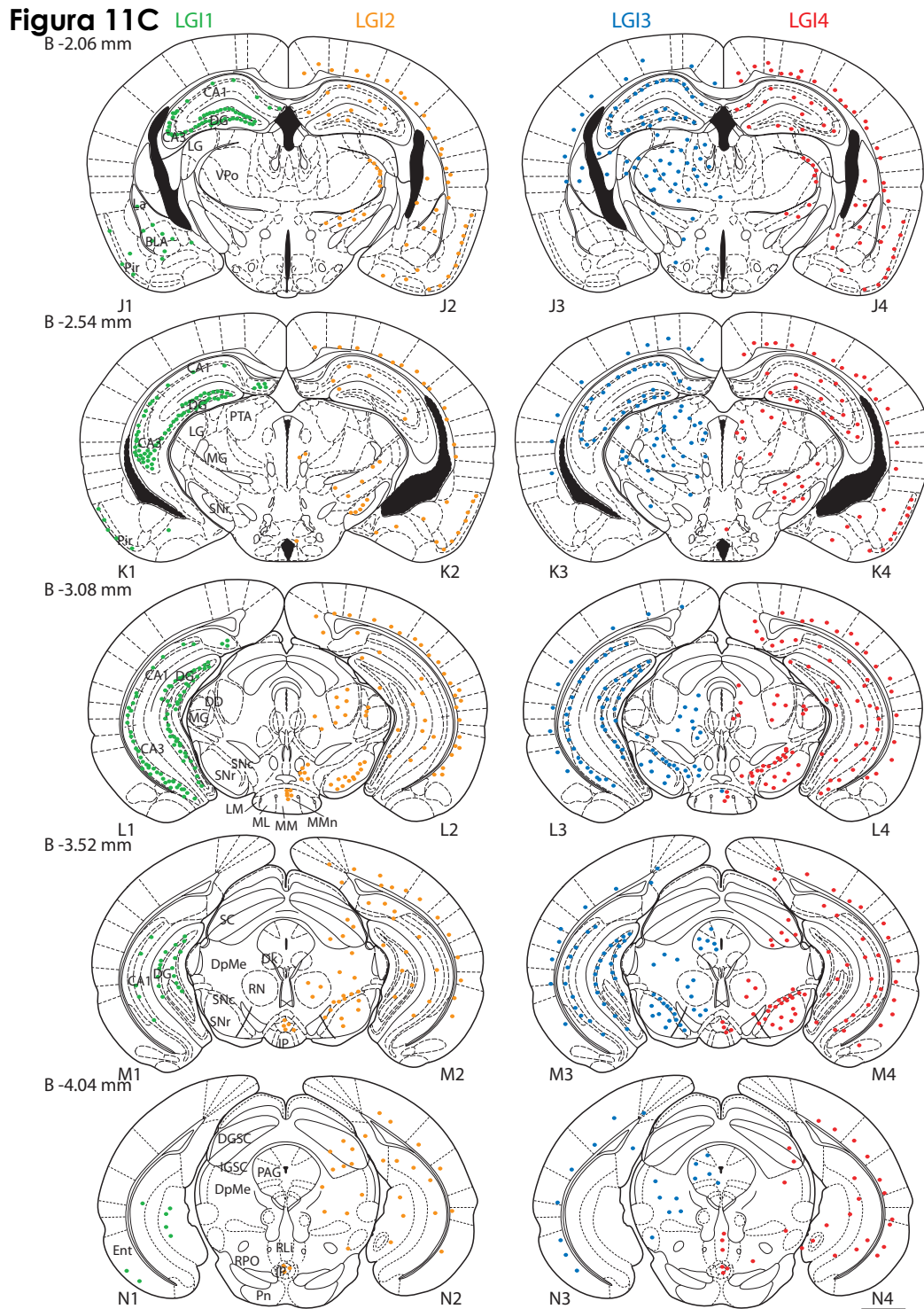


Figura 11D

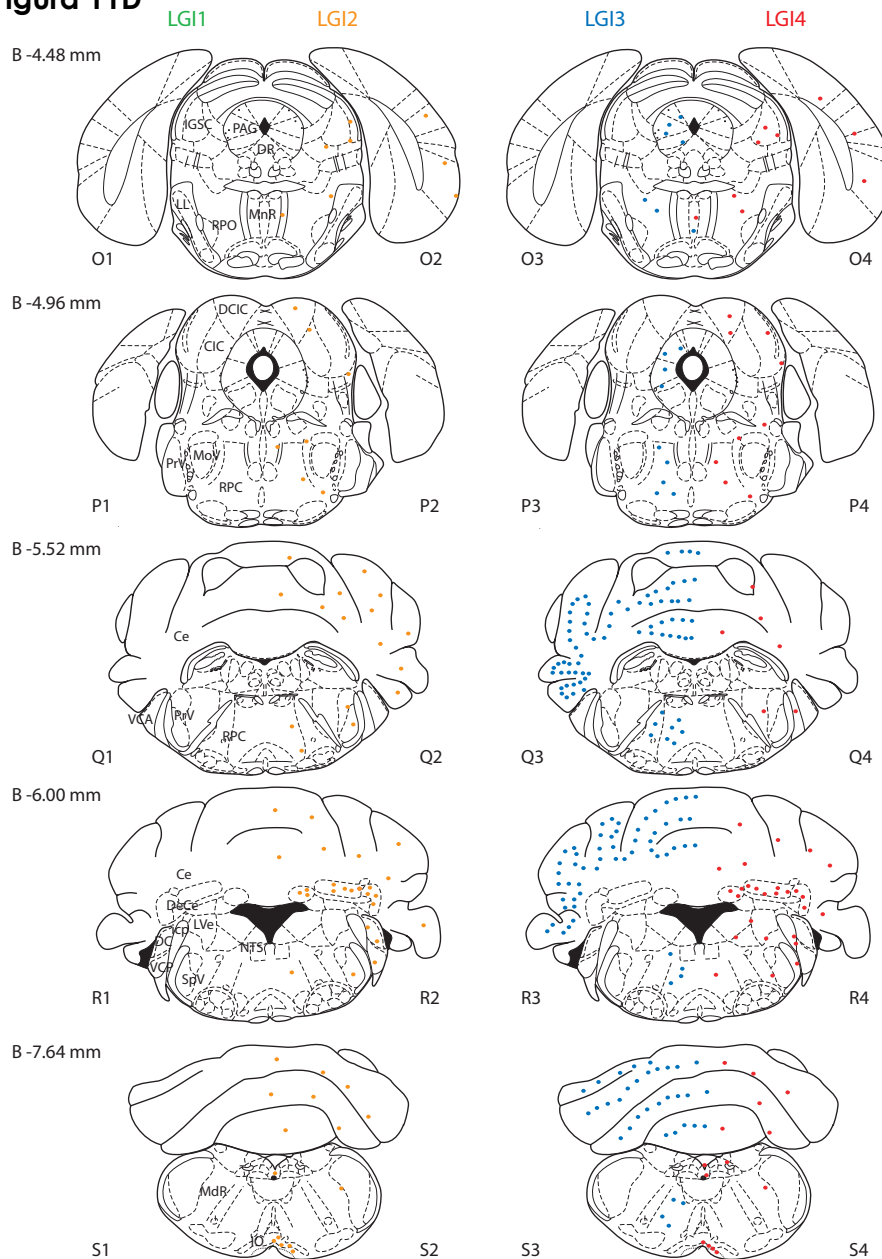


Figura 11: Diagramas mostrando la distribución e intensidad relativa del marcaje por hibridación *in situ* de los genes *LGI1-4*. Los diagramas comienzan a nivel Bregma +3.08 mm (A1-A4) y finalizan a nivel -7.64 mm (S1-S4). La separación entre diagramas consecutivos corresponde aproximadamente a 0,5 mm excepto para las series A y S. Barras de escala = 1 mm, se muestran los resultados correspondientes a *LGI1* en verde, *LGI2* en naranja, *LGI3* en azul y *LGI4* en rojo. Modificación de (Paxinos and Franklin, 2001).

4.1.1 Expresión de *LGII*.

La mayoría de células que expresaban el ARNm de *LGII*, fueron localizadas en áreas anatómicamente definidas y en pocas ocasiones se observaron de forma dispersa o aisladas. Aunque se analizaron todas las regiones del SNC, incluyendo bulbos olfatorios y médula espinal cervical, tan sólo se encontraron células marcadas en el telencéfalo (figura 11, A1-S1).

Los mayores niveles de expresión, se observaron en el giro dentado y en las zonas CA3 y CA2 de la formación hipocámpica (figura 12B). El marcaje en la zona CA1 sin embargo, era débil aunque evidente, encontrándose también algo de marcaje intenso en la zona del subículo (figura 12C). Así, la expresión de *LGII* en la formación hipocámpica estaba restringida a las capas granular y piramidal, mientras que se observaba algo de marcaje muy disperso en el subículo (figura 12C).

El marcaje en el córtex cerebral era escaso aunque patente. Ninguna zona de dicho córtex mostraba unos niveles de expresión distintos al resto y sin embargo, sí que había variaciones en la expresión entre las distintas capas de cada región cortical: las capas más internas (V-VI) mostraban una señal más intensa que las más externas (I-IV), que no ofrecían apenas marcaje. Se encontraron grupos de células marcadas en el córtex entorrinal medial y lateral (figura 12D). También se observó algo de marcaje en el córtex piriforme.

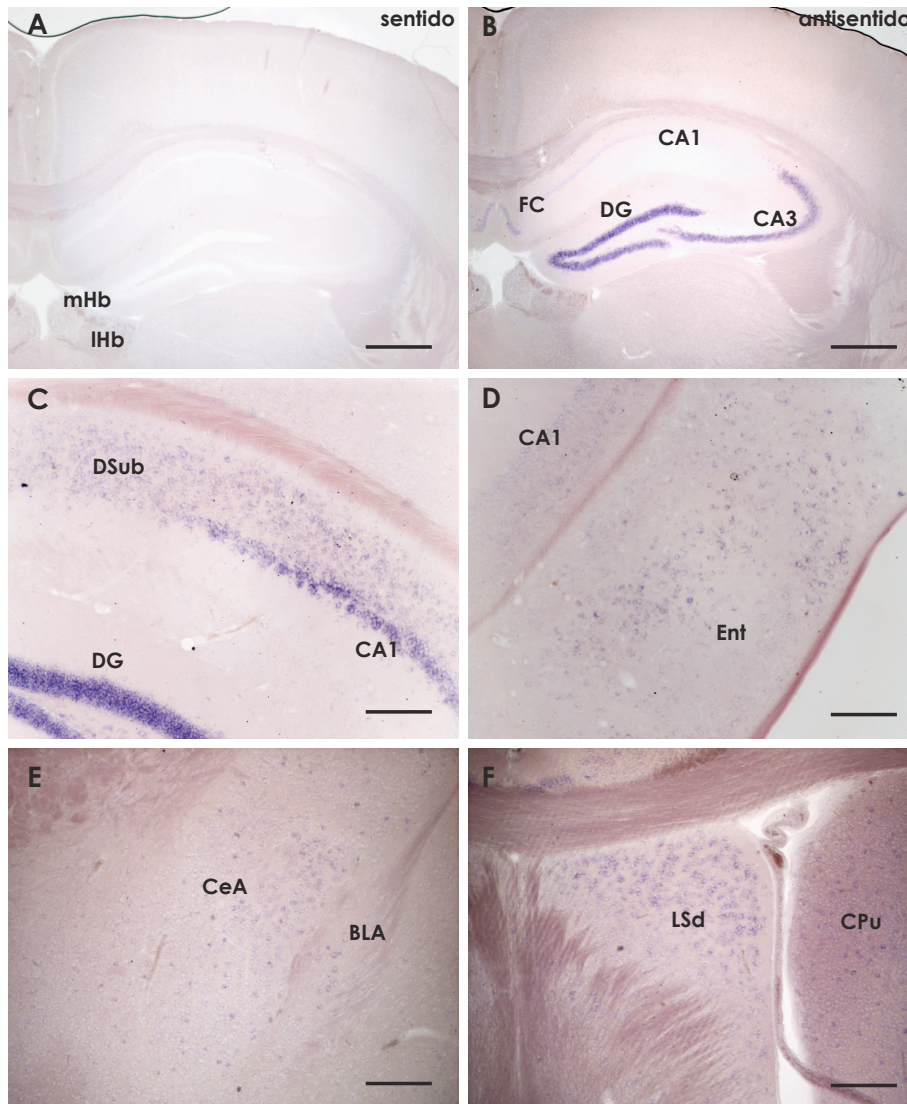


Figura 12. Fotomicrografías mostrando la expresión del gen *LGI1* en varias regiones del cerebro de ratón. A) Ausencia de marcaje para *LGI1* tras incubar con la sonda sentido *LGI1a*. B) Patrón de expresión obtenido con la sonda antisentido *LGI1a*, con intenso marcaje en el giro dentado (DG) y CA3, y más ténue en *fasciola cinerea* (FC) y CA1. C) Detalle del giro dentado (DG) y algunas células dispersas en el subí-culo dorsal (DSub) del hipocampo posterior. De igual forma, en D) se muestra un detalle del córtex entorrinal (Ent) con expresión débil pero evidente en su capa más superficial. E) Expresión del ARNm de *LGI1* en el núcleo anterior basolateral (BLA) y central (CeA) de la amígdala. En F), se aprecia también un débil marcaje para *LGI1* en la parte dorsal del núcleo lateral septal y en *putamen* (CPu). Barras de escala en A y B = 500 μ m; resto de imágenes = 200 μ m.

En la amígdala, la distribución de células que expresaban *LG11* era escasa y dispersa, pero pudieron observarse algunos grupos de células principalmente en el complejo basolateral. La amígdala central y medial, junto a la amígdala cortical, no contenía células marcadas para la expresión de *LG11* o contenía muy pocas (figura 12E).

En el *septum* lateral se observaron células marcadas, específicamente en el núcleo caudal dorsal. También se encontraron algunas células marcadas, distribuidas de forma dispersa, en el área del *caudatus putamen* (figura 12F).

No se encontraron células que expresasen el ARNm de *LG11* en los bulbos olfatorios, diencéfalo, tronco cerebral o médula espinal.

4.1.2 Expresión de *LG12*.

En el caso de *LG12*, también se observó un patrón de transcripción constante a lo largo de todo el cerebro (figura 11, A2-S2). Los transcritos de dicho gen se observaron marcados en células dispersas de todas las capas del bulbo olfatorio principal (figura 13A). También se encontraron células marcadas en el bulbo olfatorio accesorio y una fuerte señal en la división externa de los núcleos del bulbo olfatorio anterior (figura 13B).

En la corteza cerebral, el marcaje estaba presente en todas las distintas regiones corticales sin diferencias aparentes en el marcaje entre unas y otras. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias entre las distintas capas de cada región: en las capas más profundas (V-VI), las células aparecían fuertemente marcadas (aunque de forma dispersa), mientras que en las capas más superficiales (I-IV) no se encontraron células marcadas (figura 13C). Sí que se encontraron al-

gunas células marcadas pero de forma aislada en las capas II y III del córtex piriforme (figura 13D).

En la formación hipocampal, *LG12* se vio expresado de forma dispersa en el giro dentado y cuerno de Ammon. Curiosamente tanto la capa piramidal, como la capa granular, no presentaban marcaje alguno (figura 13E). Además, también se encontró marcaje densamente concentrado en las capas más profundas del subículo.

La expresión de *LG12* en el complejo amigdalario fue difusa (figura 13F), mientras que sí que se encontró un fuerte marcaje específicamente localizado en la parte supracapsular del núcleo del lecho de la estría terminal.

Dentro del área septal, se observó fuerte marcaje en la parte vertical de la banda diagonal-*septum* medial, específicamente en la zona más medial. Por el contrario, la parte horizontal y las zonas laterales del complejo de la banda diagonal-*septum* medial, no fueron marcadas (figura 13G). Tan sólo se encontraron algunos pequeños grupos de células marcadas para *LG12* en la zona lateral al *septum* medial en la zona de transición entre *septum* medial y lateral.

El patrón de expresión en los ganglios basales mostró una distribución específica: las células marcadas estaban disgregadas en el *caudatus putamen*, mientras que en el pálido se encontró una distribución de células más concentrada.

Se obtuvo un patrón de expresión bien definido en el tálamo. No se encontró marcaje en los núcleos talámicos más dorsales, con la excepción del núcleo talámico anterodorsal. El marcaje más intenso a todos los niveles, se encontró en el núcleo reticular talámico (figura 13E y 13F). Dicha zona presentó el marcaje más destacado de entre todas las regiones cerebrales.

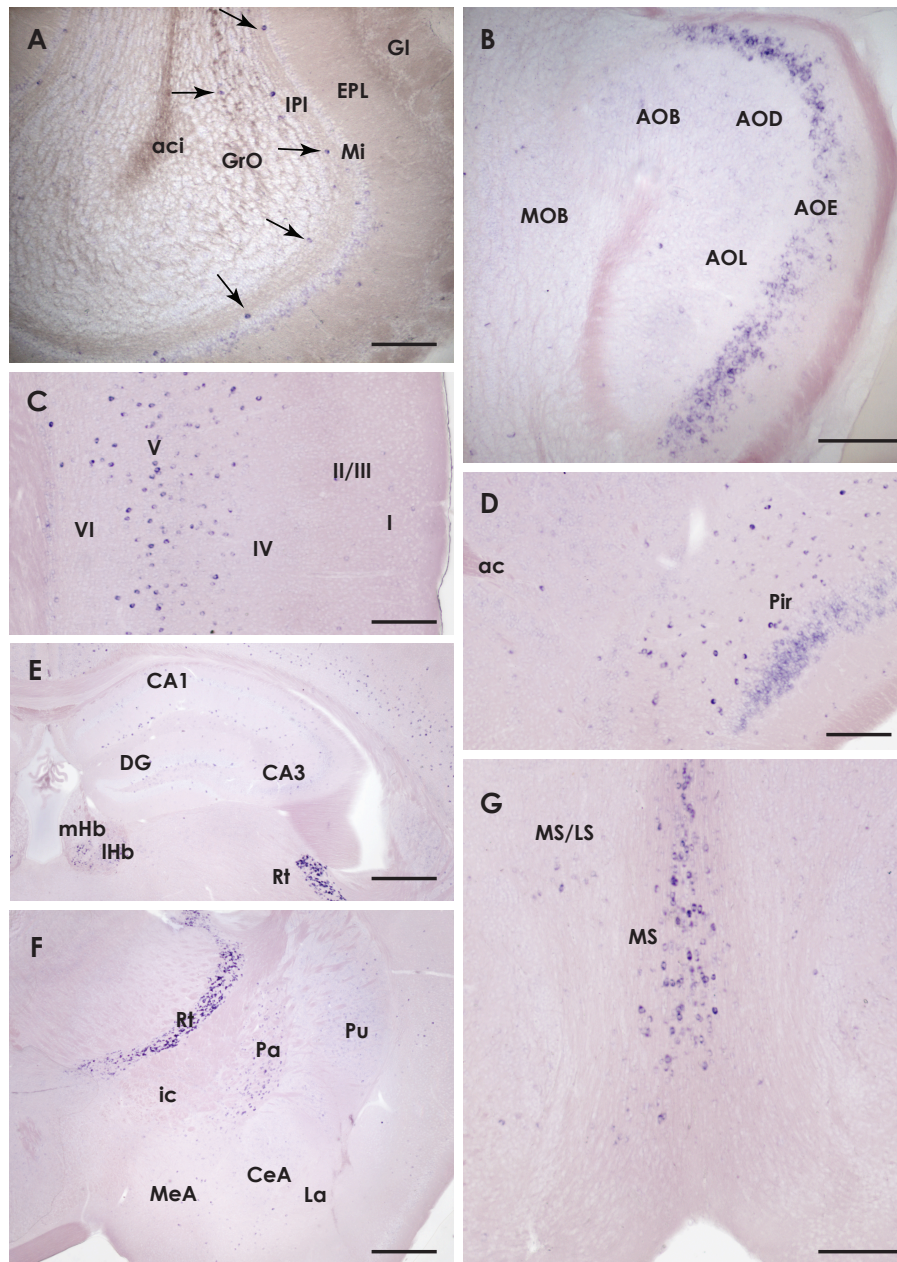


Figura 13. Distribución de los transcritos del gen *LGI2*. A) Células marcadas en el bulbo olfatorio (flechas). B) Marcaje en la division externa del bulbo olfatorio anterior (AOE). C) Córtex parietal marcado en capas profundas. D) Marcaje en el córtex piriforme (Pir). E) Células dispersas marcadas en el hipocampo y más agregado en el complejo habenular (IHB y mHb). F) Marcaje en el tálamo y ganglios basales, donde destaca la densidad del marcaje en el núcleo reticular talámico (Rt). Se observa también el marcaje en el pálido (Pa) y putamen (Pu). G) Septum medial y banda diagonal. Barras de escala en E and F = 500 μm ; resto de imágenes = 200 μm .

También a nivel talámico se encontraron grupos de células marcadas en la división ventral magnocelular del núcleo geniculado lateral. Asimismo, también se reconoció la presencia de un denso marcaje en el núcleo dorsal profundo del complejo intralaminar posterior, entre las divisiones dorsal y ventral del cuerpo geniculado medial. Aparecieron además células marcadas en la división medial del núcleo lateral habenular y algo de marcaje más difuso en las dos divisiones de la zona *incerta* (figura 14A).

Se denotó cierto marcaje débil aunque constante en todas las muestras estudiadas, en el núcleo preóptico medial y en el área preóptica medial. La división medial del núcleo mamilar medial ofreció también una señal de expresión muy evidente (figura 14B). No se observó expresión o ésta fue muy escasa en el resto de núcleos hipotalámicos.

A nivel mesencefálico, se observó fuerte marcaje en la *substantia nigra*, tanto en su *pars compacta* como *reticulata* y también en el área ventral tegmental. También se localizó expresión de *LG12* en los núcleos interpedunculares; se observaron células marcadas dispersas en varias zonas del tronco cerebral, como la porción profunda de la formación reticular mesencefálica, el núcleo intersticial de Cajal y la capa gris profunda del colículo superior. También resultaron marcadas algunas células de los núcleos pericentrales del colículo inferior y el núcleo intercolicular.

A nivel de puente y médula, había cierta expresión de *LG12* presente en los núcleos del rafe mediano y dorsal. Se encontraron células marcadas y distribuidas de forma dispersa en la formación reticular. También en la capa granular del núcleo coclear dorsal; también, aunque más débil, en los núcleos cocleares ventrales anterior y posterior. Este mismo patrón de marcaje disperso, fue observado en los núcleos vestibulares y en los núcleos principal y espinal del trigémino.

En cambio, en la oliva inferior, el marcaje encontrado fue intenso (figura 14C).

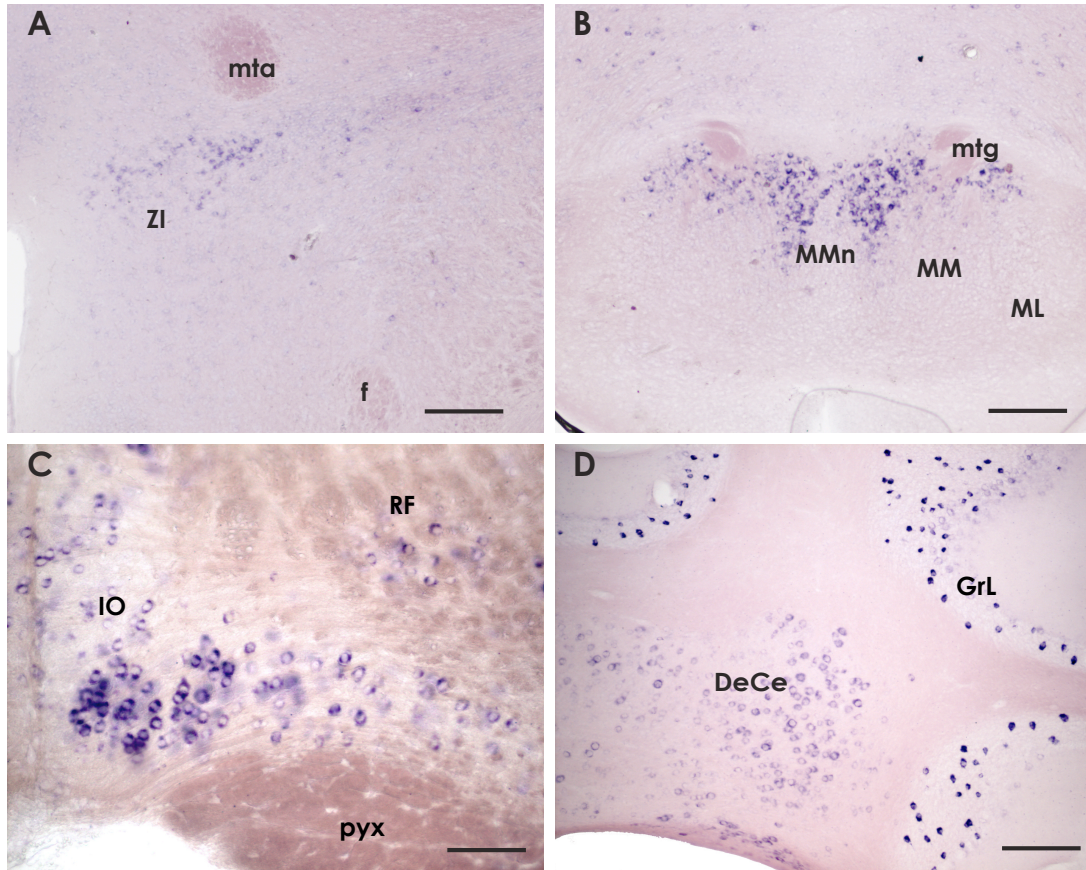


Figura 14. Fotomicrografías mostrando detalles de la expresión del ARNm de *LGI2*. A) Marcaje para *LGI2* en la zona *incerta* (ZI). B) En los cuerpos mamilares, *LGI2* se expresa específicamente en la división mediana del núcleo mamilar medial. C) Fuerte expresión en neuronas grandes del complejo de la oliva inferior y en menor medida, en la formación reticular (RF). D) En el cerebelo, se observó fuerte expresión en células dispersas de la capa granular de la lámina cerebelar y en núcleos cerebelares profundos como el núcleo dentado. Barras de escala en C y D = 100 μm ; resto de imágenes = 200 μm .

En el cerebelo, se observaron altos niveles de expresión de los transcritos de *LGI2* en una fracción de células de la capa granular de la corteza cerebelar. También se detectó algo de marcaje, si bien más débil que el anterior, en los núcleos cerebelares profundos (figu-

ra 14D). Por último, el estudio de la médula espinal no dio lugar a la detección de marcaje para este gen.

Tipo celular en el que se expresa el gen *LG12*.

El patrón de distribución de marcaje de *LG12* por hibridación *in situ*, con una gran densidad de células marcadas en el núcleo reticular talámico, *septum* medial y células no principales del hipocampo, sugería que las células que lo expresaban, o al menos parte de ellas, podían ser neuronas inhibitorias de tipo GABAérgico. Para confirmar esta hipótesis, se decidió llevar a cabo una detección inmunohistoquímica con marcadores específicos para este tipo de células.

El hecho de tener que realizar la detección inmunohistoquímica sobre muestras que ya habían sufrido el tratamiento necesario para la hibridación *in situ* redujo las opciones posibles, ya que en las pruebas llevadas a cabo, no todos los epitopos ensayados resistían el proceso. Así pues, los marcadores escogidos fueron: parvalbúmina, el propio GABA y una microinyección con *fluorogold* en hipocampo y neocórtex temporal, que debería transportarse retrógradamente hasta, entre otras regiones, el *septum* medial (que proyecta al hipocampo) y núcleo reticular talámico, núcleo compuesto en diversas especies por neuronas de tipo GABAérgico que reciben sinapsis tanto de fibras tálamo-corticales, como de fibras cortico-talámicas (Jones, 1985). En todos los casos, la detección inmunohistoquímica se realizó después del revelado para hibridación *in situ* y siguiendo un protocolo estándar para cortes flotantes con este tipo de técnica. Los anticuerpos utilizados llevaban biotina conjugada y su señal se amplificó mediante el sistema avidina-biotina-peroxidasa (ABC) para finalmente obtener un marcaje de color marrón (típico de la diaminobenzidina usada en el revelado). Este tipo de marcaje, que contrasta con el color

púrpura del obtenido en la hibridación *in situ*, permitió diferenciar entre ambos marcajes.

Del resultado de los ensayos dirigidos contra parvalbúmina se desprende que existen células en hipocampo (figura 15A), núcleo reticular talámico (figura 15B) y otras regiones, que expresan *LG12* y que son parvalbúmina-positivas. De la misma forma, cuando se detectó GABA, también se observaron células doblemente marcadas, sobre todo células no principales del hipocampo (figura 15C y 15D) y la mayoría de células del núcleo reticular talámico. En cuanto a la detección del *flurogold* microinyectado en hipocampo y neocórtex temporal, la observación del resultado de estos ensayos evidenció el transporte retrógrado al *septum* medial, donde aparecieron células doblemente marcadas una vez más (figura 15E y 15F).

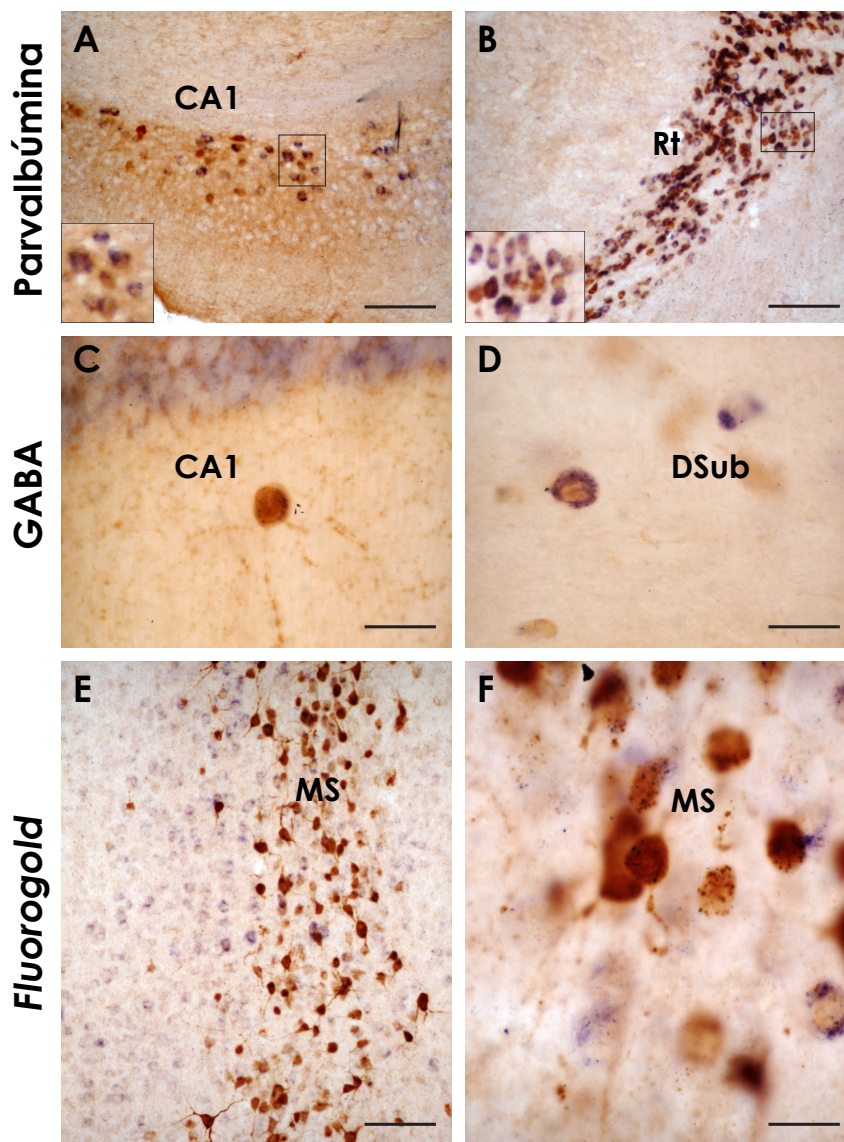


Figura 15. Fotomicrografías mostrando doble marcaje para *LGI2* (púrpura) y marcadores de GABA (marrón). A) Doble marcaje para *LGI2* y parvalbúmina en hipocampo. Se muestra una ampliación de la región enmarcada, en la esquina inferior izquierda. B) También aparecieron doblemente marcadas la mayor parte de células del núcleo reticular talámico. Se muestra una ampliación de la región enmarcada, en la esquina inferior izquierda. En C) y D), se observa el doble marcaje resultante de la detección de *LGI2* y GABA en hipocampo. En E) y F) se muestra el doble marcaje de células del septum medial, como consecuencia del transporte retrógrado de *fluorogold* desde el hipocampo, donde había sido microinyectado. Barras de escala en A, B y E = 100 μm ; resto de imágenes = 20 μm .

4.1.3 Expresión de *LG13*.

A diferencia de lo que ocurría con el resto de los genes de la familia *LGI*, el mensajero del gen *LG13* se detectó con un patrón más difuso en el diencéfalo y más restringidamente en el resto del cerebro (figura 11 A3-S3). Se encontraron algunas células marcadas en la capa granular de los bulbos olfatorios principal y accesorio, con algo de marcaje también en la capa mitral del primero de ellos.

En el neocórtex se observó marcaje difuso para *LG13* sin aparentes diferencias regionales. Se encontró fuerte marcaje en la capa granular del giro dentado y en la capa piramidal del cuerno de Ammon (figura 16A), todo ello junto a algo de marcaje muy disperso en diferentes capas de la formación hipocámpal. En la amígdala, se detectaron altos niveles de expresión en los núcleos central y lateral (figura 16B) así como en el pálido y algunas células del *caudatus putamen*. Se encontraron también numerosas células marcadas en el tálamo, principalmente en la zona dorsal (figura 16C). Aunque la señal para *LG13* fue encontrada en casi todos los núcleos talámicos, incluyendo el núcleo de la habénula medial (figura 16D), la intensidad del marcaje era débil. En el subtálamo, se detectó algo de expresión en la zona *incerta* y los núcleos medial y lateral. La señal observada en los núcleos supraóptico, paraventricular, ventromedial y mamilar del hipotálamo también fue ténue. No se observó marcaje para *LG13* en los colículos superior e inferior, en contraste con el fuerte marcaje encontrado en la sustancia gris periacueductal. Los núcleos oculomotores, exhibieron niveles más bajos de expresión, no obstante. Se observó también algo de marcaje en la *substantia nigra pars compacta*, la cual era más intensa que la encontrada en la *pars reticulata*, como puede observarse en la figura 16E. También se encontró marcaje evidente para *LG13* en el rafe mediano (figura 16F). No se encontró mar-

caje para *LGI3* en los núcleos interpeduncular e interfascicular, pero sí se detectó algo de señal en el área ventral tegmental.

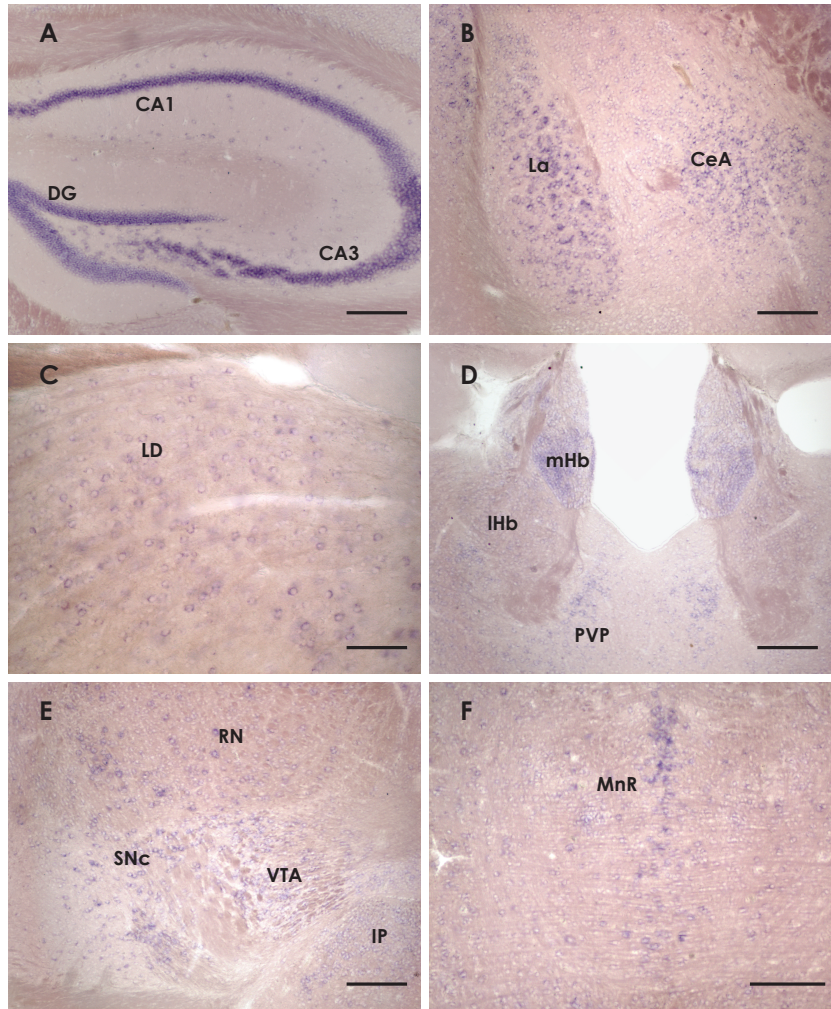


Figura 16. Fotomicrografías mostrando la expresión de *LGI3*. A) Marcaje para *LGI3* en las neuronas granulares y piramidales del giro dentado y cuerno de Ammon. Posibles interneuronas marcadas en el resto de capas. B) El marcaje en el núcleo lateral y la división medial de la amígdala fue intenso. C) Marcaje disperso en el núcleo talámico laterodorsal. D) El marcaje de *LGI3* en la habénula medial (mHb) contrasta con la ausencia de señal en la habénula lateral (lHb). E) También se observó algo de marcaje en *substantia nigra* (SN), área ventral tegmental (VTA) y núcleo interpeduncular (IP). F) Expresión de *LGI3* presente en el rafe mediano (MnR). Barras de escala en C = 100 μ m; resto de imágenes = 200 μ m.

A lo largo de la formación reticular, se pudo observar expresión del transcrito de *LG13* asociado a células grandes localizadas en la formación reticular mesencefálica, *reticularis pontis oralis* y *caudalis*, y la división magnocelular de la formación reticular medular. En el cerebelo, se localizaron algunas células marcadas en los núcleos cerebelares profundos y en la capa de células de Purkinje. No se detectó marcaje para *LG13* en la médula espinal.

4.1.4 Expresión de *LG14*.

El patrón de expresión del gen *LG14* resultó ser muy similar al observado para *LG12* y correspondió con áreas anatómicas bien definidas (figura 11 A4-S4). El marcaje de *LG14* en el bulbo olfatorio fue muy parecido al descrito para los transcritos del gen *LG12*. Se encontraron células marcadas en la capa granular del bulbo olfatorio principal y del bulbo olfatorio accesorio.

En la corteza cerebral, el patrón de expresión fue el mismo que se ha descrito para los genes *LG11* y *LG12*: ciertas células de capas profundas (V-VI) exhibieron un fuerte marcaje para *LG14*, mientras que las capas más superficiales (I-IV) quedaron sin marcaje alguno (figura 17A).

Se detectó algo de expresión del ARNm de *LG14* en la capa II del córtex piriforme y en el núcleo endopiriforme. En la formación hipocámpal, el patrón observado fue ligeramente diferente al descrito para *LG12*: se observó un marcaje mayoritariamente débil en las capas piramidal y granular, mientras que células que identificamos como no principales, se marcaron intensamente (figura 17B). También se detectó algo de expresión, aunque de forma débil en la amígdala, si bien sí que se observó un grupo de células marcadas en la división

lateral medial del núcleo central. Sí que se observó un marcaje más destacado en la porción supracapsular de la estricta terminal.

El patrón de expresión en el *septum* medial fue idéntico al observado en el caso del gen *LGI2*, estando éste restringido a la parte vertical de la banda diagonal y su subdivisión más medial. Este marcaje fue la zona con mayor densidad e intensidad de marcaje para *LGI4* observado en el cerebro (figura 17C). Además, algunas de las células marcadas para *LGI4*, se concentraban en la zona de transición entre *septum* lateral y *septum* medial.

Se localizó algo de marcaje en el *caudatus putamen*, aunque como ocurriera en el caso de *LGI2*, se encontró marcaje más intenso en el *globus pallidus* lateral (figura 17D y 17E).

Como en el caso de *LGI2*, la señal más intensa encontrada a nivel del tálamo, fue la observada en el núcleo reticular talámico (figura 17E). También se encontraron ciertas células marcadas en la zona *incerta* y en el núcleo lateral de la habénula, así como en el núcleo dorsal profundo del complejo paralaminares talámico (figura 17F).

A nivel mesencefálico, se detectaron células marcadas para el gen *LGI4* en la formación reticular profunda, núcleos prefrontales anteriores, núcleo de Darkschewitch y núcleo de la comisura posterior. También se encontró marcaje intenso para *LGI4* tanto en la *pars compacta* como en la *pars reticulata* de la *substantia nigra* (figura 18A), área ventral tegmental y en el núcleo interpeduncular rostro-dorsal (figura 18B y 18C). Se observó algo de marcaje también en los núcleos pericentrales del colículo inferior, así como una fuerte expresión de *LGI4* en células aisladas en la zona intercolicular. No se detectó marcaje en el colículo superior ni en la sustancia gris periacueductal.

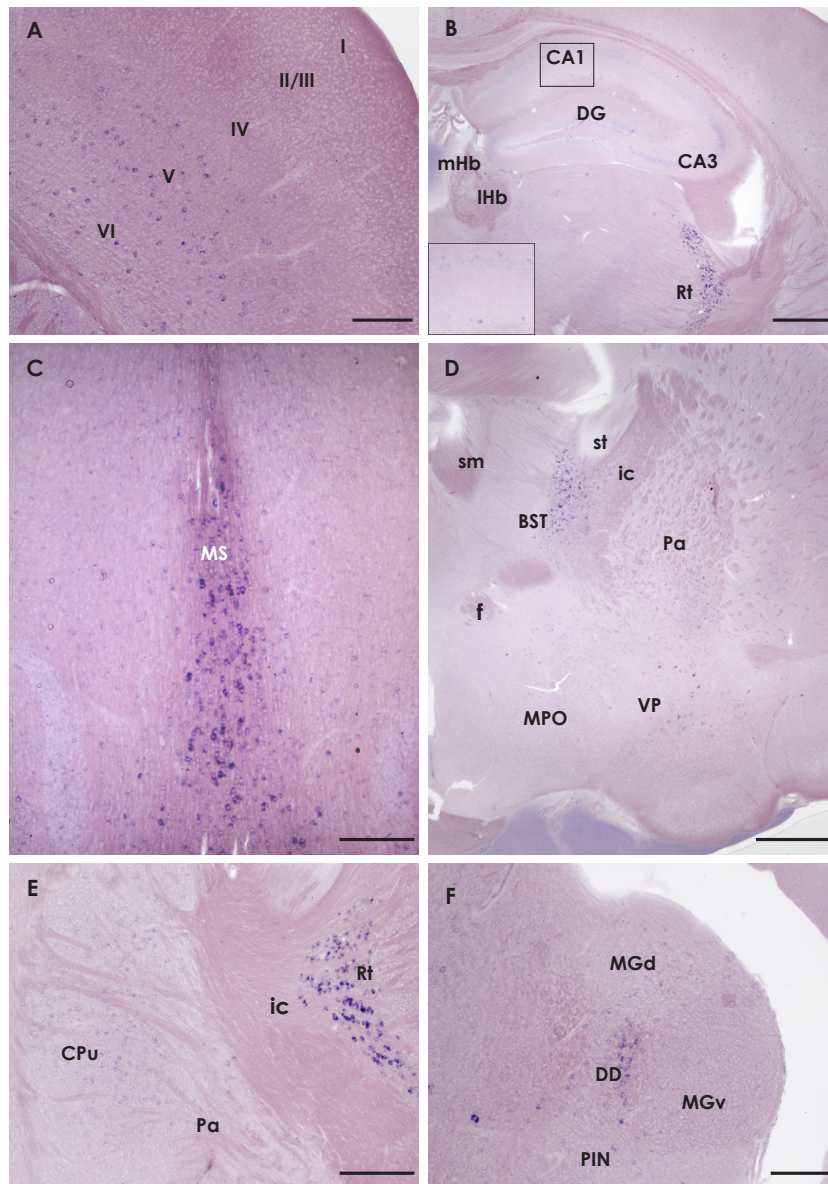


Figura 17. Fotomicrografías mostrando la expresión del ARNm del gen *LGI4*. A) Marcaje en capas profundas del córtex parietal. B) En el hipocampo *LGI4*, se encontró en células dispersas, aunque estaba también presente en las capas granular y piramidal y en el núcleo reticular. Se muestra una ampliación de la región enmarcada, en la esquina inferior izquierda. C) *LGI4* en la parte vertical de la banda diagonal del septum medial (MS). D) Fuerte marcaje presente en la división supracapsular del núcleo de la estria terminal (BST). E) Marcaje disperso en *putamen* y pálido lateral. F) Grupo de células marcado específicamente en el núcleo profundo dorsal (DD) del complejo intralamina posterior (PIN). Barras de escala en B y D = 500 μm ; resto de imágenes = 200 μm .

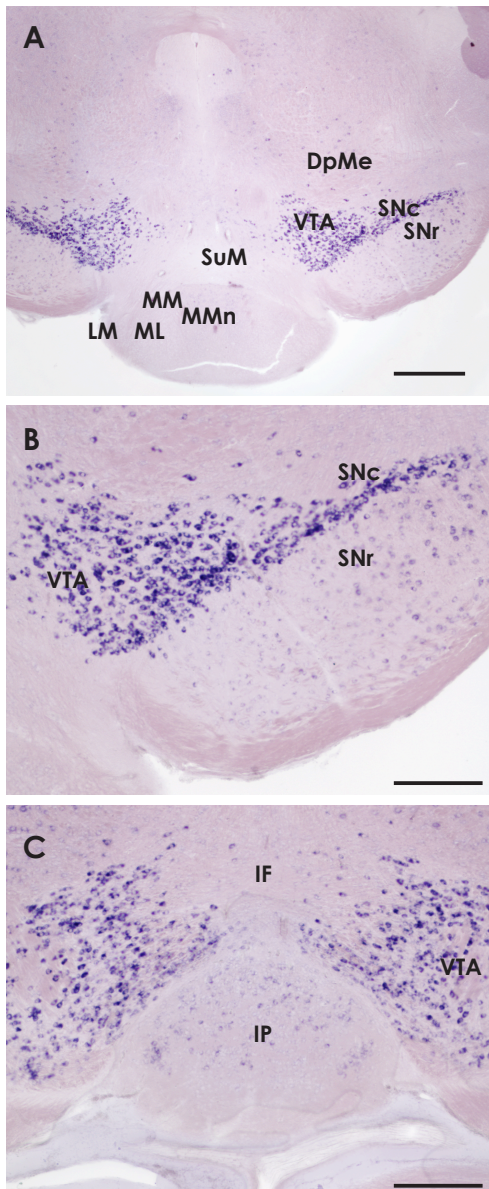


Figura 18. Fotomicrografías mostrando algunos detalles de la expresión del ARNm del gen *LGI4*. A) Imagen mostrando el fuerte marcaje para *LGI4* en la *pars compacta* de la *substantia nigra* (SNc) y el área ventral tegmental (VTA). Marcaje disperso en la formación reticular profunda mesencefálica (DeMe) y en la *pars reticulata* de la *substantia nigra* (SNr). *LGI4* no se observó en el núcleo supramamilar (SuM) ni en otros núcleos mamilares (mMM, IMM, LM). B) Ampliación del marcaje para *LGI4* observado en la *substantia nigra* (SN) y el área ventral tegmental (VTA). C) En el mesencéfalo caudal, la expresión de *LGI4* fue detectada en el núcleo interpeduncular (IP) y en el núcleo interfascicular (IF). Barras de escala en A = 500 μm ; resto de las imágenes = 200 μm .

En puente, médula y cerebelo, el patrón de expresión para *LGI4* fue prácticamente idéntico al observado para el gen *LGI2*. Se observó cierto marcaje difuso en el rafe mediano y dorsal y en la formación reticular. La expresión para *LGI4* estaba también presente en los núcleos cocleares, vestibulares y trigeminales, mientras que se observó un intenso marcaje también en la oliva inferior. En el cerebelo, se encontró un fuerte marcaje en algunas células de la capa granular de la corteza cerebelar, mientras que también se observó marcaje,

más débil en este caso, en núcleos cerebelares profundos. No se detectó marcaje alguno para *LGI4* en la médula espinal.

4.2 Estudio del efecto de la presencia de repeticiones EPTP en el destino celular de *LGI1*.

Como ya se señaló en la *Introducción*, existen evidencias experimentales previas que demuestran que *LGI1* es una proteína de secreción (Senechal et al., 2005; Sirerol-Piquer et al., 2006), que además está glicosilada (Sirerol-Piquer et al., 2006). *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, compuesto por siete repeticiones dispuestas en tándem. En estudios previos de este laboratorio, también se determinó el impacto de cada uno de estos dos dominios en la secreción de *LGI1*. Para ello, se clonó el péptido señal de *LGI1* seguido de las LRR 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 para su expresión en células HEK 293T y posterior detección por *Western blot* en lisados celulares y su medio. El resultado obtenido fue que, la construcción con el péptido señal y las LRR queda retenida en la célula, mientras que la construcción con péptido señal y el dominio EPTP es secretada al medio (Sirerol-Piquer et al., 2006). Teniendo en cuenta este resultado y para avanzar en el conocimiento del proceso de secreción de la proteína, decidimos determinar el mínimo número de repeticiones tipo EPTP necesario para que la proteína *LGI1* sea secretada. Para eso, se generaron construcciones quiméricas con distinto número de repeticiones EPTP (desde 0 hasta las 7 de la proteína silvestre). De esta forma, se intentó

restablecer la secreción de la construcción sin el dominio EPTP (0 EPTP en la figura 19A), añadiendo una a una, cada repetición. Para ello, se transfectaron las distintas construcciones generadas, en células HEK 293T y posteriormente se concentraron los lisados celulares y los medios obtenidos por inmunoprecipitación para detectar por *Western blot* la presencia de estas proteínas. La figura 19B demuestra que sólo la proteína completa (LG11^{FL}), es decir, con las siete repeticiones EPTP es secretada.

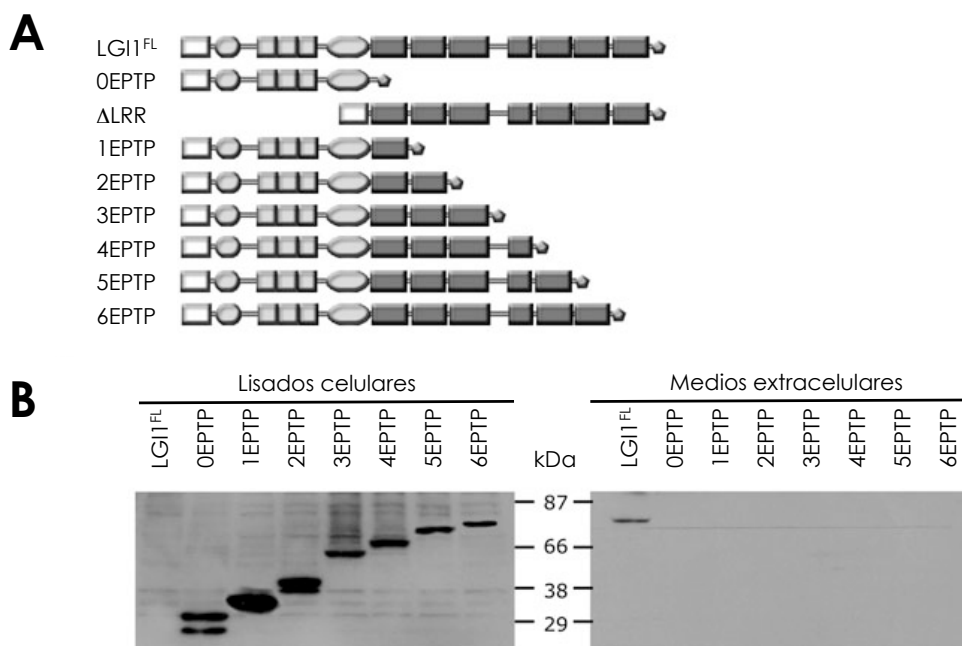


Figura 19. Mínimo número de repeticiones EPTP en LG11 para su secreción. A) Representación esquemática de las diferentes construcciones etiquetadas con Flag usadas en el experimento. B) *Western blots* de lisados celulares (izquierda) y medios de cultivo (derecha) de células HEK 293T. Las células se transfectaron con versiones de LG11 con distinto número de repeticiones EPTP. Todas las construcciones fueron expresadas, inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-Flag generado en conejo y posteriormente detectadas con el anticuerpo *Sigma M2 anti-Flag* (generado en ratón) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP de la casa comercial Jackson (dilución 1:1000 y 1:5000 respectivamente). Sólo la forma completa de LG11 fue detectada en el medio extracelular (modificado de Sirerol-Piquer et al., 2006).

4.3 Ensayos de unión de AP-LGI1 soluble a la membrana celular.

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 es 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 and Cheng, 2000; Flanagan et al., 2000). La etiqueta AP (fosfatasa alcalina) tiene una actividad enzimática intrínseca que se puede detectar fácilmente con diferentes sustratos cromogénicos. La isoforma AP humana de la placenta es muy estable, así que LGI1 se clonó en el vector pc DNA3.1AP6 (cedido por la Dra. Alyson Fournier, *Montreal Neurological Institute, McGill University, Canadá*) en posición C-terminal con respecto a la etiqueta AP.

El objetivo de este experimento era demostrar que añadiendo LGI1 exógenamente a cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata (CGN), 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 por medio de centricones. La concentración de AP-LGI1 y AP se estimó mediante la medida enzimática de la fosfatasa alcalina en el

medio por medio del 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 CGN tras 48 horas en cultivo. Las células se trataron con medios condicionados que contenían AP-LGI1 o AP a una concentración de 22 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 no se observa unión de AP a la superficie de las células granulares de cerebelo de rata tratadas con medio control (figura 20A y 20C). Sin embargo, sí encontramos una fuerte unión de la proteína de fusión AP-LGI1, marcándose tanto el soma como las neuritas de las células tratadas con este tipo de medio (figura 20B y 20D). De esta manera, concluimos que la unión de AP-LGI1 a la superficie de células granulares de cerebelo de rata, es una unión específica.

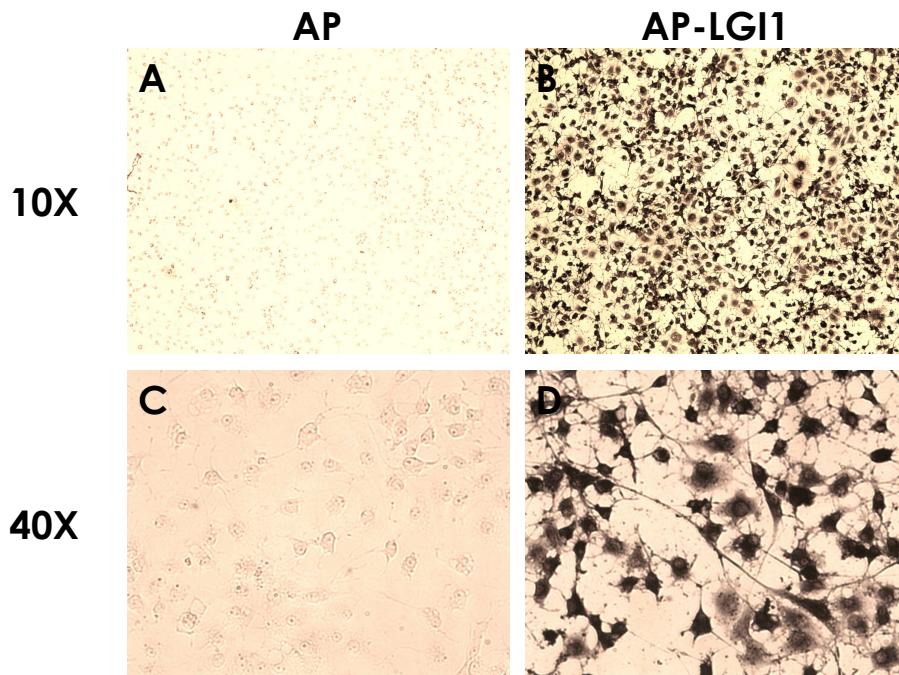


Figura 20. Unión de AP-LGI1 a células granulares de cerebelo. A) Fotomicrografía de CGN control tratadas con medio condicionado AP (10X). B) Imagen de células tratadas con AP-LGI1 (10X). B). C) Detalle de CGN control tratadas con AP (40X). D) CGN tratadas con medio AP-LGI1 fuertemente marcadas (40X).

Discusión

Capítulo 5

Discusión

La identificación en 2001 de *LGII* como gen responsable de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante (ADLTE, Morante-Redolat et al., 2002) abrió una nueva perspectiva en el estudio de epilepsias de origen genético, ya que fue uno de los primeros genes descubiertos que, no codificando para un canal de membrana, era causante de una epilepsia. Además, el pronto descubrimiento de *LG12*, *LG13* y *LG14* como parálogos del gen, con una estructura genómica muy parecida entre ellos (Gu et al., 2002b) y localizados todos en *loci* ligados a varios tipos de epilepsia sin gen responsable conocido (Staub et al., 2002), supuso un nuevo campo de estudio para las epilepsias con un componente hereditario.

Desde el momento en que se definió la subfamilia *LGI* (Gu et al., 2002b), la mayor parte del esfuerzo de los grupos de investigación dedicados a la materia, se centraron en la caracterización genética, proteica y funcional de estas moléculas. No obstante, el hecho de que *LGII* fuese un gen conocido previamente por su implicación en el desarrollo de glioblastomas (Chernova et al., 1998) y su responsabilidad en la ADLTE (Morante-Redolat et al., 2002), ha propiciado que el número de publicaciones y de información disponible sobre este gen sea mucho superior que para el resto de la familia *LGI*. En este sentido, el presente trabajo se ha centrado en la caracterización de *LGII*. Sin embargo se ha complementado con el estudio de la expresión del resto de miembros de la familia *LGI* y su posible aplicación a la hora de proponer una función para las proteínas codificadas por es-

tos genes. No obstante, dada la similitud estructural en cuanto a dominios proteicos, no es descartable que esta función o funciones, pudieran estar relacionadas o incluso solapadas.

5.1 Expresión de la familia génica *LGI*.

Existen pocos anticuerpos disponibles para las proteínas codificadas por estos genes, y los existentes no han funcionado de una forma fiable, al menos en nuestro caso. Por ello, no existen estudios inmunohistoquímicos exhaustivos sobre la expresión de estas proteínas. De este modo, la importancia del estudio de la expresión a nivel de ARNm de estos genes es aún más relevante. Además, el uso de hibridación *in situ* para estos estudios tiene la ventaja de que minimiza problemas comunes derivados del uso de anticuerpos, como una señal débil, o la ausencia de ratones *knock-out* para estos genes para comprobar la especificidad de la detección.

Al comienzo del presente trabajo, la única información respecto a la distribución de células que expresaban *LGI1*, era la publicada por Kalachikov y colaboradores, donde presentaban que dichas células estaban localizadas mayoritariamente en el córtex piriforme, región CA3 y giro dentado de la formación hipocámpica y amígdala (Kalachikov et al., 2002). Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis, Senechal y colaboradores publicaron un estudio comparativo sobre la distribución de *LGI1-4* (Senechal et al., 2005). Dicho trabajo no era una descripción anatómica exhaustiva (sólo se mostraba una sección sagital por cada gen) si bien, aportó importante información al respecto. La escasez de información existente y la posibilidad de que, basándonos en su estructura de dominios casi idéntica, los genes *LGI1-4*, tengan una función relacionada o parecida, nos llevó al estudio detallado de la expresión de los transcritos de estos genes en el cerebro del ratón.

5.1.1 Expresión de *LGII*.

El patrón de expresión de *LGII* en el hipocampo y la corteza cerebral, concuerda con la distribución publicada en otros estudios que usaban hibridación *in situ* con sondas marcadas con digoxigenina (Kalachikov et al., 2002; Senechal et al., 2005). Al igual que en nuestros resultados, en estos estudios se observó que la señal más intensa para expresión de *LGII*, estaba localizada en las capas granular y piramidal del giro dentado y en la región CA3 del hipocampo. Además, nuestros trabajos también coincidieron en cuanto a la expresión en córtex piriforme, amígdala y capas profundas de la corteza cerebral. Adicionalmente, en nuestras observaciones también se encontraron grupos de cuerpos celulares marcados en las capa II y III de la corteza entorrinal lateral y medial.

Los resultados expuestos en el presente trabajo, concuerdan con el patrón de expresión de *LGII* restringido al telencéfalo presentado por otros (Kalachikov et al., 2002; Senechal et al., 2005). Sin embargo, como se ha descrito en la introducción, existen estudios de expresión para este gen por medio de *Northern blot* en cerebro de ratón (Chernova et al., 1998) y por *Western blot* en humanos (Furlan et al., 2006), que también indicaron la presencia de expresión para este gen en tálamo, cerebelo y médula espinal. Estas discrepancias son lo suficientemente importantes como para ser tenidas en cuenta, y si bien podrían deberse a diferentes niveles de sensibilidad en las técnicas utilizadas en la detección, no puede descartarse que exista otra causa, como la utilización de distintas sondas. Así, podría ser que con diferentes técnicas (o sondas) utilizadas para la detección del ARNm de *LGII*, se observen resultados discrepantes.

El patrón de expresión observado, está también de acuerdo con los resultados publicados en un estudio basado en inmunohisto-

química contra LGI1, en el cual se encuentra marcaje correspondiente a la proteína en la capa molecular tanto del giro dentado como del cuerno de Ammon (Schulte et al., 2006). Esta capa, corresponde al campo terminal de la clásica vía perforante que se origina en las capas superficiales (capas II y III) de la corteza entorrinal (Witter and Amaral, 1991), pudiendo sugerir que el producto del gen *LGI1*, podría ser transportado desde los cuerpos celulares hasta los terminales. Estos datos concuerdan con la hipótesis planteada por Schulte y colaboradores, la cual propone que la proteína LGI1 podría formar parte de los canales presinápticos mediados por potasio (Schulte et al., 2006).

Por otra parte, está documentado que la división dorsal del *septum* medial, recibe proyecciones bilaterales desde la región CA3, y a su vez proyecta sobre el núcleo lateral supramamilar y el complejo *septum* medial/banda diagonal (Risold and Swanson, 1997). A su vez, el *septum* medial y el núcleo supramamilar lateral, proyectan de vuelta sobre la formación hipocampal, siendo en parte responsables de la sincronización de tipo *theta* (Kocsis and Vertes, 1994). Además, la estimulación eléctrica del núcleo supramamilar lateral, aumenta la excitabilidad sináptica de las células granulares (Carre and Harley, 1991; Mizumori et al., 1989; Nakanishi et al., 2001). Todo lo anterior se une al hecho de que la mayoría de componentes de este circuito, expresan el ARNm de *LGI1* y que la mutación de este gen provoca un aumento en la excitabilidad celular a través de su asociación a canales presinápticos de tipo Kv respecto a la forma silvestre (Schulte et al., 2006). Teniendo en cuenta todo lo anterior, estas observaciones sugieren que la conectividad entre las células que expresan LGI1, podría estar implicada en el aumento de la excitabilidad que lleva a un fenotipo epiléptico. En tales condiciones, la actividad rítmica de tipo *theta* de la que hablábamos, o bien cualquier otra actividad de alta frecuencia, podría disparar el foco de actividad epiléptica. Además, la expresión de *LGI1* en el hipocampo y en zonas aisladas de la corteza,

apoya su papel en el desarrollo de epilepsia lateral, como ha sido puesto de manifiesto anteriormente (Berkovic and Steinlein, 1999; Senechal et al., 2005) y también concuerda con el hecho de que la proteína LGI1 media en la maduración postnatal de sinápsis glutamatérgicas de tipo excitatorio en el hipocampo. Dicha maduración está drásticamente disminuida en ratones transgénicos, portadores de formas truncadas de LGI1 (Zhou et al., 2009).

5.1.2 Expresión de *LG12*.

Senechal y colaboradores, observaron un patrón de expresión para *LG12* específico en el núcleo reticular talámico y una distribución del gen más difusa a lo largo del cerebro (Senechal et al., 2005). Estos resultados concuerdan con los presentados en la presente memoria de tesis en cuanto al fuerte marcaje observado para *LG12* en el núcleo reticular del tálamo. Además, nuestras observaciones también llevaron a la detección de otras importantes localizaciones donde *LG12* se expresaba de forma intensa y específica como neuronas no principales del hipocampo, pálido, parte vertical de la banda diagonal y *septum* medial, división medial de la habénula lateral, zona *incerta* y *substantia nigra pars reticulata*. La expresión de transcritos de *LG12* en neuronas no principales del hipocampo y no en las capas granular y piramidal, así como su presencia en la parte vertical de la banda diagonal, nos llevan a especular con una posible naturaleza GABAérgica para estas células. La mayoría, si no todas las neuronas no principales del hipocampo son de naturaleza GABAérgica y contribuyen a oscilaciones rítmicas de poblaciones hipocámpales (*theta*, *gamma* y ondas de 200 Hz, (Freund and Buzsaki, 1996). También el *septum* medial contribuye a estas sincronizaciones de neuronas del hipocampo en la frecuencia *theta*, de hecho el *septum* medial es considerado el marcapasos hipocámpal (Vertes and Kocsis, 1997). El

septum medial está compuesto por una población heterogénea de neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas (Colom et al., 2005; Sotty et al., 2003), contribuyendo cada una de ellas de forma diferente a la sincronización de tipo *theta* (Sotty et al., 2003). Además, las neuronas GABAérgicas paralbúmina positivas del *septum* medial, proyectan a neuronas GABAérgicas no principales del hipocampo (Freund and Antal, 1988; Freund, 1989). El papel exacto de *LGI2* en este sistema, todavía se desconoce. Sin embargo, sí que fuimos capaces de demostrar que la naturaleza química de la mayoría de células que expresaban *LGI2* era GABAérgica, lo cual apoya esta hipótesis.

5.1.3 Expresión de *LGI3*.

Nuestros datos muestran una amplia expresión de *LGI3* en el diencéfalo, mientras que la distribución del mensajero del gen es mucho más baja en el resto del cerebro. El hecho de que *LGI3* se exprese en neuronas granulares y piramidales de la formación hipocampal, podría indicar una posible relación de la expresión de este gen con neuronas excitatorias de tipo aminoacídico. Aunque la amplia expresión de los transcritos de *LGI3* no nos permite postular una función particular para la proteína que codifica, su fuerte expresión en células del hipocampo, sugiere que podría ser considerado como un buen sistema para estudiar interacciones *LGI3*-Abeta en células piramidales y gliales.

5.1.4 Expresión de *LGI4*.

La distribución regional de los transcritos del gen *LGI4* es similar a la observada para el gen *LGI2*. De hecho, se encontraron células marcadas para *LGI4* tanto en el núcleo reticular talámico como en el

septum medial, tal y como ocurría en el caso de *LGI2*. Sin embargo, también se observaron diferencias entre la expresión de ambos genes, lo cual hace indicar que la función de sus productos también difiere. Además, al marcaje observado en neuronas no principales del hipocampo para *LGI2*, hay que añadir también marcaje en las capas granular y piramidal del hipocampo para *LGI4*. *LGI2* no se expresaba en estas últimas zonas. Por otra parte, *LGI2* se expresaba de forma intensa en el *globus pallidus*, mientras que *LGI4* se expresaba de una forma mucho más débil en esta región; *LGI2* se expresaba en el núcleo mamilar medial, que carecía de expresión en el caso de *LGI4* y por el contrario, *LGI4* se expresaba de forma más intensa que *LGI2* en el área ventral tegmental.

Nuestro patrón de expresión difiere en parte del publicado por Senechal y colaboradores, que observaron algo de expresión de *LGI4* en la corriente migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio (Senechal et al., 2005). En nuestro caso se usó una sonda localizada en el extremo 3' del cDNA del gen y una segunda sonda en la región codificante. Ambas sondas dieron lugar al mismo patrón de marcaje.

Se ha propuesto que el producto del gen *LGI4*, podría tener un papel en el desarrollo nervioso periférico. Bermingham y colaboradores, demostraron que *LGI4* se expresa en células de Schwann, mientras que formas mutantes de *LGI4*, dan lugar al ratón con fenotipo *claw paw* (Bermingham et al., 2006), el cual se caracteriza por acortamiento axonal e hipomielinización en el sistema nervioso periférico del animal. Además, los autores confirmaron que el silenciamiento del gen *LGI4* en cultivos de células de Schwann, también inhibía su mielinización, la cual se recuperaba al añadirse proteína *LGI4* exógena (Bermingham et al., 2006). Es difícil relacionar los resultados obtenidos con el efecto observado para *LGI4* en el sistema nervioso periférico.

5.2 Efecto del dominio EPTP en el destino de LGI1.

La forma silvestre de LGI1 es una proteína glicosilada y que se secreta al medio extracelular (Senechal et al., 2005; Sirerol-Piquer et al., 2006). Sin embargo, tanto la forma procesada de LGI1, como las mutaciones de esta proteína encontradas en pacientes de ADLTE son retenidas en el retículo endoplásmico de la célula, salvo en el caso de la mutación R474X, que se localizó en el aparato de Golgi. Además, usando mutaciones generadas artificialmente, se ha visto que pese a que el dominio LRR de la proteína no es necesario para su secreción, el dominio EPTP sí que juega un papel esencial en este proceso (Sirerol-Piquer et al., 2006).

En el presente trabajo se intentó determinar si existía un número mínimo de repeticiones de tipo EPTP necesario para la secreción de LGI1. Para ello se comprobó la capacidad de secreción de LGI1 con distinto número de repeticiones EPTP (desde ninguna de ellas, hasta siete) observándose que es necesario el dominio EPTP intacto para el proceso de secreción de la proteína. Estos resultados, junto con el hecho de que cualquier mutación de las ensayadas hasta la fecha da lugar a la retención de la proteína en retículo endoplásmico (o aparato de Golgi en sólo uno de los casos) (Sirerol-Piquer et al., 2006), nos lleva a pensar que la estructura terciaria de la proteína es esencial para su secreción. De esta forma, la maquinaria celular de control de calidad proteica, estaría detectando un mal plegamiento en estas proteínas mutadas, que acabarían siendo marcadas para su degradación. Según esta hipótesis, el mecanismo fisiopatológico de la ADLTE correspondería a un efecto de pérdida de función por parte de LGI1 que, probablemente por un efecto de disminución de dosis, estaría evitando su correcta función.

5.3 Unión de AP-LGI1 soluble a la superficie celular.

LGI1 se secreta al medio extracelular, y se postula que podría actuar como ligando celular (Fukata et al., 2006; Senechal et al., 2005; Sirerol-Piquer et al., 2006). Para comprobarlo, ensayamos la capacidad de la proteína de fusión AP-LGI1 para unirse a la superficie celular de células granulares de cerebelo de rata respecto a AP, observando que AP-LGI1 se une de forma específica a este tipo celular. Posteriormente, se publicó que AP-LGI1 era capaz de unirse tanto a células COS7, como a células PC12 diferenciadas a fenotipo neuronal mediante NGF. Además se demostró que dicha unión ocurría de forma dosis-dependiente y saturable (Sirerol-Piquer et al., 2006). Estos ensayos han sido repetidos recientemente por (Owuor et al., 2009) en cultivos primarios de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de pollo y en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata, confirmándose que AP-LGI1 se une a la superficie de estas células de forma dosis-dependiente. Sin embargo, en dicho trabajo se concluye que AP-LGI1 no tiene capacidad de unión por si sola a células COS7 no transfectadas, necesitando para dicha unión de la expresión de la proteína ADAM23. Tras ensayar la capacidad de unión de varios miembros de la familia ADAM, determinan que ADAM23 es el receptor específico para LGI1 en la superficie celular y dada la capacidad de ADAM23 para interaccionar con integrinas $\alpha v \beta 3$, moléculas de adhesión implicadas en el desarrollo de neuritas (Cal et al., 2000), comprobaron que LGI1 actúa como ligando de ADAM23 y estimula el crecimiento de neuritas en neuronas DRG y neuronas de hipocampo. Estos resultados fueron validados por medio de un ratón transgénico *knock-out* para ADAM23, cuyo fenotipo presenta crisis de tipo tónico/clónico y de viabilidad limitada. El ratón heterocigoto ADAM23 +/-, pese a tener una viabilidad y comporta-

miento normales, presentaba una mayor susceptibilidad a sufrir crisis inducidas por pentilenotetrazol (PTZ) (Owuor et al., 2009).

5.4 Discusión general.

La familia *LGI* era totalmente desconocida hasta hace pocos años. Desde entonces, la relación de *LGI1* con el desarrollo de glioblastomas primero (Chernova et al., 1998), y con la epilepsia lateral temporal autosómica dominante después (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002), ha impulsado enormemente la investigación de esta molécula. En este momento se tienen evidencias de que las cuatro proteínas codificadas por esta familia génica, son proteínas de secreción (Senechal et al., 2005) y que al menos *LGI1* (Owuor et al., 2009; Zhou et al., 2009) y *LGI4* (Birmingham et al., 2006), ejercen su función en la maduración del sistema nervioso central y periférico respectivamente. En un principio, se especuló con la posibilidad de que más de un miembro de la familia estuviera relacionado con algún tipo de epilepsia, dado que todos mapeaban en *loci* ligados a distintas afecciones de este tipo (Staub et al., 2002). Hasta la fecha no se ha confirmado tal extremo, si bien no puede descartarse que en un futuro ocurra; la distribución de los transcritos de estos genes en el cerebro de ratón es compatible con esta posibilidad.

La mayoría de esfuerzos dedicados al estudio de estos genes, se han enfocado al esclarecimiento de los mecanismos celulares en los que están implicados. Se ha publicado que *LGI1* es un ligando extracelular que se une a la proteína de membrana *ADAM23* para ejercer su función como estimulador del crecimiento de neuritas (Owuor et al., 2009). Por otra parte, parece que dicho efecto podría estar relacionado con el remodelado y maduración que *LGI1* podría estar ejerciendo sobre neuronas glutamatérgicas del hipocampo (Zhou et al., 2009). Ambas hipótesis podrían ser totalmente compatibles, si bien

los mecanismos subyacentes no se conocen por el momento. En cualquier caso, con los datos de los que se dispone en este momento, es probable que LGI1 tenga un efecto sobre el desarrollo postnatal del sistema nervioso central, que como consecuencia de las mutaciones que afectan a pacientes de ADLTE, se ve alterado, dando lugar a una red de conexiones neuronales alterada. En tales circunstancias, la susceptibilidad a crisis epilépticas sería mayor y ante estímulos que en un individuo normal no causarían una crisis, un individuo portador de una mutación en LGI1, sí que las padecería. Esta hipótesis está apoyada por la deficiencia en la maduración observada en los modelos *knock-out* para LGI1 (Zhou et al., 2009) y su probable receptor ADAM23 (Owuor et al., 2009). La expresión de LGI1 predominante en hipocampo (Kalachikov et al., 2002; Senechal et al., 2005) y similar a la observada para ADAM23 (Owuor et al., 2009), también respaldan los resultados obtenidos a nivel molecular.

El gen *LGI2* es probablemente el más desconocido de los miembros de la familia *LGI*. El estudio de las relaciones filogenéticas entre los cuatro genes presentes en mamíferos y su topología, indica que el origen de éstos se debe a dos eventos de duplicación génica o genómica que dio lugar a las parejas de genes *LGI1/LGI4* y *LGI2/LGI3* a partir de un hipotético *LGI* ancestral. Durante el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*), los ancestros de estos genes (*LGI1a*, *LGI1b*, *LGI2a*, *LGI2b* y *LGI3*) se expresan de forma casi complementaria y en patrones apenas solapantes en el sistema nervioso, lo cual sugiere una subfuncionalización de cada miembro de la familia en procesos relacionados con el desarrollo de este sistema (Gu et al., 2005). Sin embargo, nuestros estudios en cerebro de ratón, muestran un patrón de expresión semejante aunque no idéntico, entre *LGI2* y *LGI4* pese a que a nivel filogenético, estos dos genes están más alejados entre sí que con *LGI3* y *LGI1* respectivamente. Dicho patrón de expresión y la posible naturaleza GABAérgica de las células donde se

expresa, nos hace sugerir que dado que este gen se expresa en regiones muy características en la generación del ritmo *theta*, la proteína que codifica *LGI2* podría tener que ver con dicha función. Sería interesante comprobar el efecto del silenciamiento de dicho gen sobre este ritmo *theta* como prueba de ello.

LGI3 ha sido relacionado con la respuesta de los astrocitos a la acumulación del péptido Abeta (Kimura et al., 2007; Okabayashi and Kimura, 2007; Okabayashi and Kimura, 2008). De ser así, la función de *LGI3* divergería de las propuestas para *LGI1* y *LGI4*, relacionados con el desarrollo del sistema nervioso (Owuor et al., 2009; Zhou et al., 2009) y (Bermingham et al., 2006). Por otra parte, también se ha señalado que *LGI3* interacciona de forma física con syntaxina-1 un componente del complejo SNARE de la ruta de exocitosis (Park et al., 2008). De esta forma, *LGI3* parece tener por una parte un papel regulador en la endocitosis neuronal (Okabayashi and Kimura, 2007), y también en la exocitosis, por medio de su interacción con syntaxina-1 (Park et al., 2008). La distribución del mensajero del gen que codifica a esta proteína no nos permite aportar evidencias al respecto, si bien es del todo compatible con las hipótesis planteadas por otros autores.

Como se mencionaba anteriormente, también existen evidencias de la implicación de *LGI4* en el desarrollo del sistema nervioso periférico. Concretamente, *LGI4* actúa extracelularmente promoviendo el proceso de mielinización de axones por parte de células de Schwann (Bermingham et al., 2006). El estudio de la expresión de los transcritos de *LGI4* en el SNC no aporta mucha información en este sentido, aunque dado que el gen también se expresa en cerebro, es probable que también ejerza alguna función en esta región. En esta dirección, es interesante el hecho de que se ha observado que existe una interacción física entre la proteína *LGI4* y ADAM22 y otros componentes de la familia ADAM (al igual que ocurre con *LGI1*). Los auto-

res de este trabajo proponen que la interacción de unas u otras proteínas, podría estar determinado por la expresión específica de cada una en cada tipo celular (Sagane et al., 2008). Sin embargo, dada la similaridad existente entre ambas proteínas a nivel de dominios, no es descartable que las interacciones propuestas respondan en parte a artefactos debidos a uniones inespecíficas. En cualquier caso, ambas hipótesis, LGI4 como agente inductor de la mielinización en el sistema nervioso periférico y LGI4 como ligando de otra molécula en el sistema nervioso central, no son en absoluto excluyentes.

Conclusiones

Conclusiones

1. La distribución de transcritos de los genes de la familia *LGI* es regionalmente heterogénea, lo que hace pensar que desde su origen a partir de un gen ancestral común sufrieron una subfuncionalización.
2. La expresión del gen *LGI1* está restringida a la región telencefálica, distribuyéndose mayoritariamente en la formación hipocámpal, amígdala, corteza piriforme y entorrinal, y capas profundas de la corteza cerebral. Esta distribución apoya las hipótesis planteadas por la literatura reciente proponiendo que *LGI1* podría inducir la maduración de sinápsis de neuronas glutamatérgicas del hipocampo durante el desarrollo del sistema nervioso central.
3. El gen *LGI2*, se expresa de forma intensa en el núcleo reticular talámico, células no principales del hipocampo y *septum* medial. Muchas de las células positivas para *LGI2* también fueron clasificadas como GABAérgicas. Las anteriores observaciones nos llevan a proponer que *LGI2* podría ejercer su función en el mecanismo de generación del ritmo de tipo *theta*.
4. *LGI3* se expresa abundantemente en diencéfalo y de forma más débil y difusa en el resto de regiones cerebrales con la excepción del hipocampo. Podría ser considerado como un buen sistema para estudiar interacciones *LGI3*-Abeta en células piramidales y gliales en hipocampo.

5. El gen *LGI4*, se expresa con una distribución muy similar a *LGI2* aunque con ciertas diferencias a nivel regional. Aunque su expresión en el sistema nervioso central no aporta información sobre el papel que *LGI4* ejerce en el sistema nervioso periférico, no debe descartarse que esta proteína tenga funciones distintas según la región o el momento en que se expresa.
6. El dominio de repeticiones EPTP de la proteína *LGI1* es necesario para la secreción de la proteína al medio extracelular. Es necesario que dicho dominio contenga todas las repeticiones de tipo EPTP para que la proteína se secrete con éxito. Este hecho se debe probablemente, a la necesidad de la presencia de la totalidad de repeticiones del dominio para un correcto plegamiento de la proteína.
7. La proteína de fusión AP-*LGI1* se une específicamente a la superficie celular de neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo. Este hecho viene apoyado por el descubrimiento reciente de un receptor específico para esta proteína, a través del cual se propone que ejerce su función.

Anexos

Anexos

Anexo 1: Publicaciones.

Parte del trabajo presentado en esta memoria de tesis, aparece publicado en los siguientes trabajos:

1. **The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface.** Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Pérez V, Favell K, Barker PA, Pérez-Tur J. Hum Mol Genet. 2006 Dec 1;15(23):3436-45. Epub 2006 Oct 26.
2. **Regional distribution of the leucine-rich glioma inactivated (LGI) gene family transcripts in the adult mouse brain.** Herranz-Pérez V, Olucha-Bordonau FE, Morante-Redolat JM, Pérez-Tur J. Brain Res. 2009. PMID: 19833108.

Bibliografía

Bibliografía

- Andermann, F., Kobayashi, E., Andermann, E., 2005. Genetic focal epilepsies: state of the art and paths to the future. *Epilepsia*. 46 Suppl 10, 61-7.
- Berkovic, S.F., Steinlein, O.K., 1999. Genetics of partial epilepsies. *Adv Neurol*. 79, 375-81.
- Berkovic, S.F., Izzillo, P., McMahon, J.M., Harkin, L.A., McIntosh, A.M., Phillips, H.A., Briellmann, R.S., Wallace, R.H., Mazarib, A., Neufeld, M.Y., Korczyn, A.D., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., 2004. LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology*. 62, 1115-9.
- Bermingham, J.R., Jr., Shearin, H., Pennington, J., O'Moore, J., Jaegle, M., Driegen, S., van Zon, A., Darbas, A., Ozkaynak, E., Ryu, E.J., Milbrandt, J., Meijer, D., 2006. The claw paw mutation reveals a role for Lgi4 in peripheral nerve development. *Nat Neurosci*. 9, 76-84.
- Besleaga, R., Montesinos-Rongen, M., Perez-Tur, J., Siebert, R., Deckert, M., 2003. Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. *Virchows Arch*. 443, 561-4.
- Bonaventura, C.D., Carni, M., Diani, E., Fattouch, J., Vaudano, E.A., Egeo, G., Pantano, P., Maraviglia, B., Bozzao, L., Manfredi, M., Prencipe, M., Giallonardo, T.A., Nobile, C., 2009. Drug resistant ADLTE and recurrent partial status epilepticus with dysphasic features in a family with a novel LGI1 mutation: electroclinical, genetic, and EEG/fMRI findings. *Epilepsia*.

- Buchanan, S.G., Gay, N.J., 1996. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 65, 1-44.
- Cal, S., Freije, J.M., Lopez, J.M., Takada, Y., Lopez-Otin, C., 2000. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the α v β 3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 11, 1457-69.
- Caroni, P., Schwab, M.E., 1988. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol.* 106, 1281-8.
- Carre, G.P., Harley, C.W., 1991. Population spike facilitation in the dentate gyrus following glutamate to the lateral supramammillary nucleus. *Brain Res.* 568, 307-10.
- Chabrol, E., Popescu, C., Gourfinkel-An, I., Trouillard, O., Depienne, C., Senechal, K., Baulac, M., LeGuern, E., Baulac, S., 2007. Two novel epilepsy-linked mutations leading to a loss of function of LGI1. *Arch Neurol.* 64, 217-22.
- Chernova, O.B., Somerville, R.P., Cowell, J.K., 1998. A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene.* 17, 2873-81.
- Colom, L.V., Castaneda, M.T., Reyna, T., Hernandez, S., Garrido-Sanabria, E., 2005. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse.* 58, 151-64.
- Fertig, E., Lincoln, A., Martinuzzi, A., Mattson, R.H., Hisama, F.M., 2003. Novel LGI1 mutation in a family with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology.* 60, 1687-90.

- Flanagan, J.G., Cheng, H.J., 2000. Alkaline phosphatase fusion proteins for molecular characterization and cloning of receptors and their ligands. *Methods Enzymol.* 327, 198-210.
- Flanagan, J.G., Cheng, H.J., Feldheim, D.A., Hattori, M., Lu, Q., Vanderhaeghen, P., 2000. Alkaline phosphatase fusions of ligands or receptors as in situ probes for staining of cells, tissues, and embryos. *Methods Enzymol.* 327, 19-35.
- Forsgren, L., Beghi, E., Oun, A., Sillanpaa, M., 2005. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol.* 12, 245-53.
- Freund, T.F., Antal, M., 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature.* 336, 170-3.
- Freund, T.F., 1989. GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res.* 478, 375-81.
- Freund, T.F., Buzsaki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6, 347-470.
- Fujita, Y., Ikeda, A., Kadono, K., Kawamata, J., Tomimoto, H., Fukuyama, H., Takahashi, R., 2009. [Clinical features in a Japanese patient with autosomal dominant lateral temporal epilepsy having LGI1 mutation]. *Rinsho Shinkeigaku.* 49, 186-90.
- Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., Fukata, M., 2006. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science.* 313, 1792-5.
- Furlan, S., Roncaroli, F., Forner, F., Vitiello, L., Calabria, E., Piquer-Sirerol, S., Valle, G., Perez-Tur, J., Michelucci, R., Nobile, C., 2006. The

- LGII/epitempin gene encodes two protein isoforms differentially expressed in human brain. *J Neurochem.* 98, 985-91.
- Gu, W., Brodtkorb, E., Steinlein, O.K., 2002a. LGII is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol.* 52, 364-7.
 - Gu, W., Wevers, A., Schroder, H., Grzeschik, K.H., Derst, C., Brodtkorb, E., de Vos, R., Steinlein, O.K., 2002b. The LGII gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins. *FEBS Lett.* 519, 71-6.
 - Gu, W., Gibert, Y., Wirth, T., Elischer, A., Bloch, W., Meyer, A., Steinlein, O.K., Begemann, G., 2005. Using gene-history and expression analyses to assess the involvement of LGI genes in human disorders. *Mol Biol Evol.* 22, 2209-16.
 - Hedera, P., Abou-Khalil, B., Crunk, A.E., Taylor, K.A., Haines, J.L., Sutcliffe, J.S., 2004. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: two families with novel mutations in the LGII gene. *Epilepsia.* 45, 218-22.
 - Horner, P.J., Gage, F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.* 407, 963-70.
 - ILAE, C.o.C.a.T.o.t., 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 30, 389-99.
 - Jones, E.G., 1985. *The thalamus, Vol.*, Plenum, New York.
 - Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Martinelli Boneschi, F., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., Yu, A., Cayanis, E., Penchaszadeh, G., Kottmann,

- A.H., Pedley, T.A., Hauser, W.A., Ottman, R., Gilliam, T.C., 2002. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet.* 30, 335-41.
- Kimura, N., Ishii, Y., Suzaki, S., Negishi, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., 2007. Abeta upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 335-50.
 - Kobayashi, E., Santos, N.F., Torres, F.R., Secolin, R., Sardinha, L.A., Lopez-Cendes, I., Cendes, F., 2003. Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol.* 60, 1546-51.
 - Kocsis, B., Vertes, R.P., 1994. Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J Neurosci.* 14, 7040-52.
 - Krex, D., Hauses, M., Appelt, H., Mohr, B., Ehninger, G., Schackert, H.K., Schackert, G., 2002. Physical and functional characterization of the human LGI1 gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathol (Berl).* 103, 255-66.
 - Kunapuli, P., Chitta, K.S., Cowell, J.K., 2003. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene.* 22, 3985-91.
 - Kunapuli, P., Kasyapa, C.S., Hawthorn, L., Cowell, J.K., 2004. LGI1, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway. *J Biol Chem.* 279, 23151-7.

- Lee, S.E., Lee, A.Y., Park, W.J., Jun, D.H., Kwon, N.S., Baek, K.J., Kim, Y.G., Yun, H.Y., 2006. Mouse LGI3 gene: expression in brain and promoter analysis. *Gene*. 372, 8-17.
- Lees, G.V., Jones, E.G., McNamara, J., 2000. Epilepsy. *Neurobiol Dis*. 7, 549-51.
- Mandemakers, W.J., Barres, B.A., 2005. Axon regeneration: it's getting crowded at the gates of TROY. *Curr Biol*. 15, R302-5.
- Michelucci, R., Poza, J.J., Sofia, V., de Feo, M.R., Binelli, S., Bisulli, F., Scudellaro, E., Simionati, B., Zimbello, R., D'Orsi, G., Passarelli, D., Avoni, P., Avanzini, G., Tinuper, P., Biondi, R., Valle, G., Mautner, V.F., Stephani, U., Tassinari, C.A., Moschonas, N.K., Siebert, R., Lopez de Munain, A., Perez-Tur, J., Nobile, C., 2003. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families. *Epilepsia*. 44, 1289-97.
- Mizumori, S.J., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., 1989. A comparison of supramammillary and medial septal influences on hippocampal field potentials and single-unit activity. *J Neurophysiol*. 61, 15-31.
- Moller, S., Croning, M.D., Apweiler, R., 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*. 17, 646-53.
- Morante-Redolat, J.M., Gorostidi-Pagola, A., Piquer-Sirerol, S., Saenz, A., Poza, J.J., Galan, J., Gesk, S., Sarafidou, T., Mautner, V.F., Binelli, S., Staub, E., Hinzmann, B., French, L., Prud'homme, J.F., Passarelli, D., Scannapieco, P., Tassinari, C.A., Avanzini, G., Marti-Masso, J.F., Kluwe, L., Deloukas, P., Moschonas, N.K., Michelucci, R., Siebert, R., Nobile, C., Perez-Tur, J., Lopez de Munain, A., 2002. Mutations in the

- LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet.* 11, 1119-28.
- Morante-Redolat, J.M., 2006. Caracterización genética y funcional del gen causante de la epilepsia lateral temporal autosómica dominante. Vol. Ph. D., ed.Λeds. Universitat de València, Valencia, pp. 257.
 - Nakanishi, K., Saito, H., Abe, K., 2001. The supramammillary nucleus contributes to associative EPSP-spike potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci.* 13, 793-800.
 - Ohgaki, H., 2005. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology.* 25, 1-7.
 - Okabayashi, S., Kimura, N., 2007. Immunohistochemical and biochemical analyses of LGI3 in monkey brain: LGI3 accumulates in aged monkey brains. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 819-30.
 - Okabayashi, S., Kimura, N., 2008. Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid beta peptide uptake by astrocytes and endocytosis itself. *Neuroreport.* 19, 1175-9.
 - OMS, 2001a. Epilepsy: historical overview. Vol., ed.Λeds. WHO Media Centre.
 - OMS, 2001b. Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis. Vol., ed.Λeds. WHO Media Centre.
 - Ottman, R., Hauser, W.A., Susser, M., 1993. Validity of family history data on seizure disorders. *Epilepsia.* 34, 469-75.
 - Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., Pedley, T.A., Lee, J.H., Barker-Cummings, C., Lustenberger, A., Nagle, K.J., Lee, K.S., Scheuer, M.L.,

- et al., 1995. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet.* 10, 56-60.
- Ottman, R., Lee, J.H., Hauser, W.A., Risch, N., 1998. Are generalized and localization-related epilepsies genetically distinct? *Arch Neurol.* 55, 339-44.
 - Ottman, R., Winawer, M.R., Kalachikov, S., Barker-Cummings, C., Gilliam, T.C., Pedley, T.A., Hauser, W.A., 2004. LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology.* 62, 1120-6.
 - Owuor, K., Harel, N.Y., Englot, D.C., Hisama, F., Blumenfeld, H., Strittmatter, S.M., 2009. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. *Mol Cell Neurosci.*
 - Park, W.J., Lee, S.E., Kwon, N.S., Baek, K.J., Kim, D.S., Yun, H.Y., 2008. Leucine-rich glioma inactivated 3 associates with syntaxin 1. *Neurosci Lett.* 444, 240-4.
 - Pato-Pato, A., Cimas-Hernando, I., Lorenzo-Gonzalez, J.R., Vadillo-Olmo, F.J., 2004. [The economic impact of epilepsy]. *Rev Neurol.* 39, 450-3.
 - Paxinos, G., Franklin, K., 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates, Vol., Academic Press.
 - Piepoli, T., Jakupoglu, C., Gu, W., Lualdi, E., Suarez-Merino, B., Poliani, P.L., Cattaneo, M.G., Ortino, B., Goplen, D., Wang, J., Mola, R., Inverardi, F., Frassoni, C., Bjerkgvig, R., Steinlein, O., Vicentini, L.M., Brustle, O., Finocchiaro, G., 2006. Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro Oncol.* 8, 96-108.

- Pisano, T., Marini, C., Brovedani, P., Brizzolara, D., Pruna, D., Mei, D., Moro, F., Cianchetti, C., Guerrini, R., 2005. Abnormal phonologic processing in familial lateral temporal lobe epilepsy due to a new LGI1 mutation. *Epilepsia*. 46, 118-23.
- Pizzuti, A., Flex, E., Di Bonaventura, C., Dottorini, T., Egeo, G., Manfredi, M., Dallapiccola, B., Giallonardo, A.T., 2003. Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol*. 53, 396-9.
- Poza, J.J., Saenz, A., Martinez-Gil, A., Cheron, N., Cobo, A.M., Urtasun, M., Marti-Masso, J.F., Grid, D., Beckmann, J.S., Prud'homme, J.F., Lopez de Munain, A., 1999. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol*. 45, 182-8.
- Risold, P.Y., Swanson, L.W., 1997. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev*. 24, 115-95.
- Runkel, F., Michels, M., Franz, T., 2003. Fxyd3 and Lgi4 expression in the adult mouse: a case of endogenous antisense expression. *Mamm Genome*. 14, 665-72.
- Sagane, K., Ishihama, Y., Sugimoto, H., 2008. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int J Biol Sci*. 4, 387-96.
- Salas-Puig, J., Gil-Nagel, A., 2004. [Classification of epileptic seizures and syndromes: new proposals]. *Neurologia*. 19, 59-66.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L.B., Butt, A., Logan, A., 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 46, 225-51.

- Scheel, H., Tomiuk, S., Hofmann, K., 2002. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet.* 11, 1757-62.
- Schulte, U., Thumfart, J.O., Klocker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H.G., Fakler, B., 2006. The epilepsy-linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic *Kv1* channels and inhibits inactivation by *Kvbeta1*. *Neuron.* 49, 697-706.
- Selzer, M.E., 2003. Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *Lancet Neurol.* 2, 157-66.
- Senechal, K.R., Thaller, C., Noebels, J.L., 2005. ADPEAF mutations reduce levels of secreted *LGII*, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Mol Genet.* 14, 1613-20.
- Sirerol-Piquer, M.S., Ayerdi-Izquierdo, A., Morante-Redolat, J.M., Herranz-Perez, V., Favell, K., Barker, P.A., Perez-Tur, J., 2006. The epilepsy gene *LGII* encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet.* 15, 3436-45.
- Somerville, R.P., Chernova, O., Liu, S., Shoshan, Y., Cowell, J.K., 2000. Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of *LGII*. *Mamm Genome.* 11, 622-7.
- Sotty, F., Danik, M., Manseau, F., Laplante, F., Quirion, R., Williams, S., 2003. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol.* 551, 927-43.
- Staub, E., Perez-Tur, J., Siebert, R., Nobile, C., Moschonas, N.K., Deloukas, P., Hinzmann, B., 2002. The novel ETP repeat defines a

- superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends Biochem Sci.* 27, 441-4.
- Steinlein, O.K., 2004. Genes and mutations in human idiopathic epilepsy. *Brain Dev.* 26, 213-8.
 - Striano, P., de Falco, A., Diani, E., Bovo, G., Furlan, S., Vitiello, L., Pinardi, F., Striano, S., Michelucci, R., de Falco, F.A., Nobile, C., 2008. A novel loss-of-function LGI1 mutation linked to autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Arch Neurol.* 65, 939-42.
 - Tan, N.C., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., 2004. Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there". *Epilepsia.* 45, 1429-42.
 - Turnbull, J., Lohi, H., Kearney, J.A., Rouleau, G.A., Delgado-Escueta, A.V., Meisler, M.H., Cossette, P., Minassian, B.A., 2005. Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No. 2, 2491-2500.
 - Vertes, R.P., Kocsis, B., 1997. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience.* 81, 893-926.
 - Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L., Jr., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F., Mulley, J.C., 1998. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet.* 19, 366-70.
 - Westbrook, G.L., 2001. Crisis epilépticas y epilepsia. In: *Principios de neurociencia.* Vol. 1, Mc-Graw-Hill, eds. E. R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessell, Madrid, pp. 910-935.

Bibliografía

- Witter, M.P., Amaral, D.G., 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* 307, 437-59.
- Zhou, Y.D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S.E., Anderson, M.P., 2009. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med.*