



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

HspA1L, nuevo sustrato del complejo Malina-Laforina y posible interlocutor en la enfermedad de Lafora.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Tena González, Daniel

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Cotutor/a externo: SANZ BIGORRA, PASCUAL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



***HspA1L, nuevo sustrato del complejo
Malina-Laforina y posible interlocutor en
la enfermedad de Lafora.***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Daniel Tena González

TUTOR/A: Dra. M^a Adelaida García Gimeno

COTUTOR/A EXTERNO/A: Dr. Pascual Sanz Bigorra

Curso Académico: 2022/2023

VALENCIA - 01/06/2023

Índice de Figuras

Figura 1: Distribución de casos en función de su origen genético y su localización geográfica.	2
Figura 2: Esquema de la composición de Laforina y de su estructura tridimensional.	3
Figura 3: Esquema de la composición de Malina y de su estructura tridimensional.	4
Figura 4: Representación morfológica de los cuerpos de Lafora según su localización y comparación con el almidón.	5
Figura 5: Esquema resumen del procedimiento seguido para la realización del estudio.	8
Figura 6: Esquema del ciclo de actividad de las Hsp70 y estructura genérica de la familia.	10
Figura 7: Datos consensuados y normalizados de expresión de HspA1L.	12
Figura 8: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación diferencial de HspA1L.	21
Figura 9: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L endógena.	22
Figura 10: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L y el tipo de poliubiquitinación.	24
Figura 11: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L y la necesidad del complejo para su ubiquitinación.	25
Figura 12: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP para Malina.	27
Figura 13: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP para Laforina.	28

Índice de Tablas

Tabla 1: Plásmidos utilizados en la realización del proyecto	14
Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la realización del proyecto	19
Tabla 3: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de HspA1L.	20
Tabla 4: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de HspA1L endógena.	22
Tabla 5: Diseño experimental del ensayo de la topología de la ubiquitinación.	23
Tabla 6: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de necesidad de laforina.	25
Tabla 7: Diseño experimental del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP.	26

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Álbamina Sérica bovina (Bovine Serum Albumine)

CBM: Módulo de unión a carbohidratos (Carbohydrates binding module)

CHIP: Proteína de interacción con el extremo C-Terminal de Hsc70 (C-terminus of Hsc70-interacting protein)

CSC: células madre cancerígenas (cancer stem cells)

DSP: Fosfatasa de doble especificidad (Doble Specificity Phosphatase)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero Bobino Fetal (Fetal bovine serum)

GFP: Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)

Hsf1: Factor de choque térmico 1 (Heat Shock Factor 1)

NBD: Dominio de unión a nucleótidos (Nucleotid Binding Domain)

NEF: Factor de intercambio nucleotídico (Nuclear-Exchange Factor)

PBS: Tampón Fosfato Salino (Phosphate buffer Saline)

PP1: proteína fosfatasa tipo 1 (Phosphatase protein type 1)

PVDF: difluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene Difluoride)

SB: Tampón de carga (Sample Buffer)

SBD: Dominio de unión a sustrato (Substrate Binding Domain)

Resumen

La enfermedad de Lafora es una enfermedad rara y grave de carácter autosómico recesivo que se manifiesta como una epilepsia mioclónica progresiva. Actualmente no tiene cura y una vez comienzan los síntomas, la enfermedad evoluciona rápidamente produciendo demencia y degeneración neuronal, además de la aparición de convulsiones tónico-clónicas, alucinaciones transitorias, síntomas neuropsiquiátricos, cambios de comportamiento, deterioro cognitivo y alteraciones respiratorias. De forma general los pacientes con esta enfermedad acaban postrados en cama y fallecen en torno a los 10 años posteriores al inicio de los síntomas.

Esta patología está causada por mutación en uno de estos genes, *EPM2A* que codifica para Laforina (una fosfatasa de doble especificidad que defosforila hidratos de carbono complejos) o *EMP2B*, que codifica Malina (una E3-ubiquitin ligasa). Estas dos proteínas forman un complejo funcional. Alteraciones de las mismas causan una desregulación en el metabolismo del glucógeno, generando agregados insolubles de poliglucosanos que se van acumulando en el citoplasma de células del sistema nervioso, corazón, músculo esquelético e hígado. Además se encuentran alterados la autofagia, la expresión de proteínas de respuesta a choque térmico, y existe un aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación crónica, entre otros eventos.

Se han estudiado extensamente las alteraciones que produce la enfermedad, pero todavía se desconocen todos los intermediarios moleculares que las producen. Es por ello que el grupo dirigido por el Dr. Pascual Sanz en colaboración con el grupo liderado por Dr. Ugo Mayor, realizaron un ensayo de ubiquitinación de alto rendimiento, con el fin de conocer nuevos posibles sustratos del complejo Laforina/Malina. El ensayo se realizó en la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) la cual expresaba una versión silvestre de Malina u otra asociada a la patología carente de funcionalidad (Malina-P69A).

En este trabajo se valida a HspA1L como sustrato del complejo Laforina/Malina mediante ensayos en los que sufre una ubiquitinación diferencial en condiciones patológicas. Además, se establece que esta ubiquitinación diferencial tiene lugar también con HspA1L endógena presente en nuestro modelo de estudio (HEK293). Se demuestra que la poliubiquitinación que el complejo confiere a HspA1L es del tipo K63 y que el papel de Laforina en la ubiquitinación es un papel regulador. Por último se ha verificado la interacción directa entre HspA1L y los componentes del complejo Laforina/Malina.

Palabras clave

Enfermedad de Lafora, Malina, Laforina, ubiquitinación, HspA1L, interacción y modulación.

Summary

Lafora disease is a rare and severe autosomal recessive disease that manifests as a progressive myoclonic epilepsy. There is currently no cure and once symptoms begin, the disease progresses rapidly leading to dementia and neuronal degeneration, as well as the onset of tonic-clonic seizures, transient hallucinations, neuropsychiatric symptoms, behavioural changes, cognitive impairment and respiratory disturbances. In general, patients with this disease become bedridden and die within 10 years of the onset of symptoms.

This pathology is caused by mutation in one of these genes, *EPM2A* which codes for Laforin (a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates) or *EMP2B*, which codes for Malin (an E3-ubiquitin ligase). These two proteins form a functional complex. Alterations in these proteins cause dysregulation of glycogen metabolism, generating insoluble polyglucosan aggregates that accumulate in the cytoplasm of cells of the nervous system, heart, skeletal muscle and liver. In addition, autophagy, expression of heat shock response proteins, increased oxidative stress, mitochondrial dysfunction and chronic neuroinflammation, among other events, are altered. The alterations produced by the disease have been extensively studied, but all the molecular intermediates that produce them are still unknown. That is why the group led by Dr. Pascual Sanz in collaboration with the group led by Dr. Ugo Mayor, performed a high-throughput ubiquitination assay, with the aim of discovering new possible substrates of the Laforin/Malin complex. The assay was performed in the HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) cell line, which expressed either a wild-type version of Malin or a pathology-associated non-functional version (Malin-P69A).

In this work, HspA1L is validated as a substrate of the Laforin/Malin complex by assays in which it undergoes differential ubiquitination under pathological conditions. Furthermore, it is established that this differential ubiquitination also occurs with endogenous HspA1L present in our study model (HEK293). It is shown that the polyubiquitination that the complex confers to HspA1L is of the K63 type and that the role of Laforin in ubiquitination is a regulatory role. Finally, the direct interaction between HspA1L and the components of the Laforin/Malin complex has been verified.

Key Words

Lafora disease, Malin, Laforin, ubiquitination, HspA1L, interaction and modulation

Índice

1. Introducción	1
1.1 Enfermedad de Lafora	1
1.2 Bases moleculares de la enfermedad	1
1.2.1 Laforina y Malina	2
1.2.2 Cuerpos de Lafora	4
1.3 Alteraciones en la enfermedad de Lafora	6
1.3.1 Neuroinflamación	6
1.4 Tratamientos actuales y perspectivas futuras	7
1.5 Experimento de ubiquitinación de alto rendimiento	8
1.5.1 Chaperonas y la familia Hsp70	9
1.6 Chaperonas y la enfermedad de Lafora	10
1.7 HspA1L	11
2. Hipótesis y objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1 Cultivos celulares	14
3.2 Extracción de plásmidos	14
3.3 Transfección de cultivos celulares	15
3.4 Cuantificación de proteína mediante Bradford	15
3.5 Ensayo de ubiquitinación	16
3.6 Ensayo de inmunoafinidad por GFP (GFP-TRAP)	17
3.7 Precipitación de proteínas mediante ácido tricloroacético (TCA)	17
3.8 Western Blot	18
3.9 Anticuerpos	18
4. Resultados	20
4.1 Ubiquitinación de HspA1L por parte del complejo Laforina/Malina	20
4.2 Topología de la ubiquitinación	23
4.3 HspA1L sólo necesita a Malina para su ubiquitinación	24
4.4 HspA1L interacciona de forma directa con Malina y Laforina	26
5. Discusión	29
6. Conclusiones	33
7. Líneas futuras	34
8. Bibliografía	35

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Lafora

La enfermedad de Lafora es una enfermedad rara y grave (OMIM 254780 / ORPHA 501) de carácter autosómico recesivo que se manifiesta como una epilepsia mioclónica progresiva. Actualmente no tiene cura y aparece en la etapa final de la infancia o en la adolescencia, con un rango establecido que se sitúa entre los 5 y los 20 años en los casos más tardíos, aunque es más común su aparición entre los 14 y 16 años.

Los pacientes de Lafora pueden sufrir convulsiones de diferentes tipos, como mioclónicas, occipitales, tónico-clónicas generalizadas, de ausencia y atónicas (Nitschke et al., 2018). Una vez comienzan los síntomas, la enfermedad se evoluciona rápidamente produciendo demencia y degeneración neuronal, además de poder presentar alucinaciones transitorias, síntomas neuropsiquiátricos como apatía, cambios de comportamiento y depresión, disartria y alteraciones respiratorias (El Tahry et al., 2015). De forma general los pacientes con esta enfermedad acaban postrados en cama y fallecen entorno a los 10 años posteriores al inicio de los síntomas por *status epilepticus* o debido a neumonía por aspiración o complicaciones derivadas del deterioro del sistema nervioso (Striano et al., 2008).

La enfermedad fue descrita en 1911 por Gonzalo Rodríguez Lafora, discípulo de Ramón y Cajal, cuando reportó en una autopsia de un paciente con epilepsia mioclónica y demencia la presencia de “cuerpos amiloides”, según describió él, en el protoplasma de las células ganglionares (Gentry et al., 2018). Su prevalencia es muy baja, entorno a unos 4 casos por millón de personas, por lo que se le atribuye la denominación de enfermedad rara (Julie et al., 2016). Hasta la fecha se han descrito unos 250 casos, entre los que se pueden encontrar casos pertenecientes a una misma familia (Singh & Ganesh, 2009).

1.2 Bases moleculares de la enfermedad

La enfermedad de Lafora está causada por mutación en uno de estos genes, *EPM2A* que codifica para Laforina (una fosfatasa de doble especificidad que defosforila hidratos de carbono complejos) o *EMP2B* que por otro lado contiene la información de Malina (una E3-ubiquitin ligasa), las cuales forman un complejo funcional. Hasta la fecha se han descrito más de 90 mutaciones diferentes para ambos genes incluyendo mutaciones de cambio de aminoácido, de pauta de lectura, mutaciones sin sentido o deleciones.

En cuanto a su prevalencia, la proporción de las mutaciones en ambos genes y su distribución geográfica es desigual. En países como Italia, Japón o Países Bajos las mutaciones en *EPM2B* son mucho más prevalentes, mientras que en España, Francia o Estados Unidos se encuentra una mayor proporción de mutaciones en *EPM2A* (Kecmanović et al., 2016). En la **Figura 1** se muestra un esquema de su prevalencia.

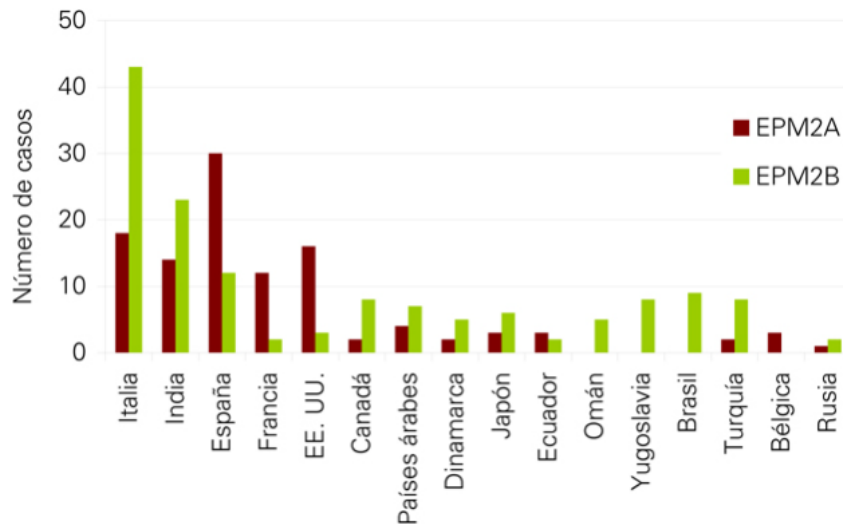


Figura 1: Distribución de casos en función de su origen genético y su localización geográfica. En rojo se pueden apreciar los casos derivados de la mutación de *EPM2A* (Laforina) y en verde los casos debido a mutaciones en el gen *EPM2B* (Malina) (Extraído de Julie et al., 2016).

A pesar de que la enfermedad de Lafora puede originarse a partir de la mutación en dos genes diferentes, el fenotipo de los pacientes es mayoritariamente idéntico y clínicamente son indistinguibles. Aunque resulta difícil correlacionar un fenotipo con mutaciones concretas debido a una alta heterogeneidad alélica y frecuentes heterocigotos compuestos por diferentes combinaciones, se han podido atribuir pequeñas diferencias fenotípicas como trastornos del aprendizaje en la infancia seguido de epilepsia y deterioro neurológico, a mutaciones en el exón 1 de *EPM2A* o un desarrollo más lento de la enfermedad debido a un cambio aminoacídico en *EPM2B*, 436 G>A (Kecmanović et al., 2016).

1.2.1 Laforina y Malina

Como se ha comentado anteriormente, el gen *EPM2A* codifica la proteína Laforina localizada en el genoma humano en el locus Cr. 6 q24. Consta de 331 aminoácidos y se expresa mayoritariamente en cerebro, músculo esquelético, corazón e hígado (Ganesh et al., 2001). Esta proteína contiene un módulo de unión a carbohidratos (CBM) en el extremo N-terminal y un dominio con actividad fosfatasa de doble especificidad (DSP) en el extremo C-terminal. Hasta la fecha es la única fosfatasa humana conocida que posee este dominio de unión a carbohidratos y, además, es capaz de defosforilar tanto fosfoserinas y fosfotreoninas, como fosfotirosinas (Gentry et al., 2007) (Sankhala et al., 2015).

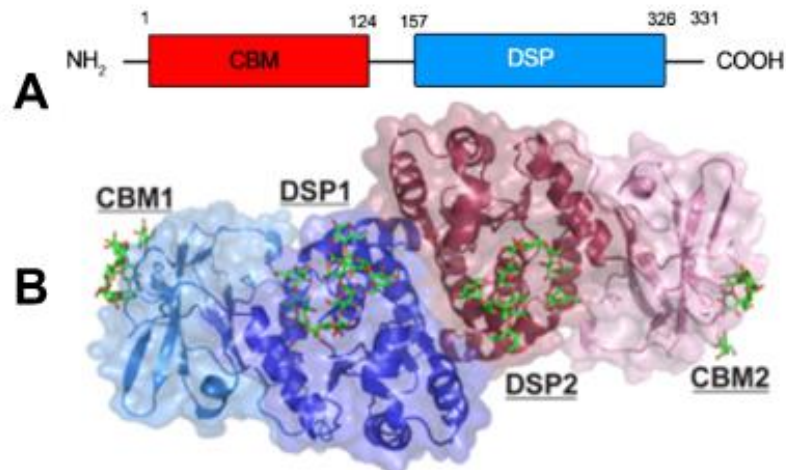


Figura 2: Esquema de la composición de Laforina y de su estructura tridimensional. A) Se pueden apreciar la posición de ambos dominios, CBM en rojo y DSP en azul, así como el intervalo de aminoácidos al que pertenecen. B) Estructura tridimensional de Laforina en forma de dímero en la cual se aprecian ambos monómeros, tanto en azul como en rojo, así como los dominios que lo conforman. Las estructuras verdes corresponden a carbohidratos (figura extraída y modificada de Raththagala et al., 2015).

Laforina pertenece a la familia de las fosfatasa de especificidad dual y ésta se encuentra englobada en la superfamilia de las fosfatasa de tirosina. Su actividad enzimática se debe a un residuo de cisteína en el centro catalítico y su mecanismo de acción se encuentra muy conservado (Gentry & Pace, 2009). Como se observa en la **Figura 2**, la estructura de Laforina cristalizada pertenece a una forma dimérica, aunque se conoce que la forma monomérica es la más abundante y que esta dimerización no causa impedimento alguno en su actividad ni en su unión a sustrato, además de no suponer un mecanismo de regulación de la actividad (Dukhande et al., 2011).

La otra parte del complejo lo conforma Malina, codificada por el gen *EPM2B/NHLRC1* y localizado en Cr.6 p22. Como se puede observar en la **Figura 3**, está formada por 395 aminoácidos, un dominio RING en posición N-terminal, encargado de la ubiquitinación, y 6 dominios NHL en posición C-terminal cuya función es la interacción con otras proteínas gracias a su estructura de barril beta (Gentry et al., 2005). Esta proteína está conservada en las 5 clases de vertebrados y es la única en su genoma con un dominio RING y 6 dominios NHL exclusivamente (Romá-Mateo et al., 2011).

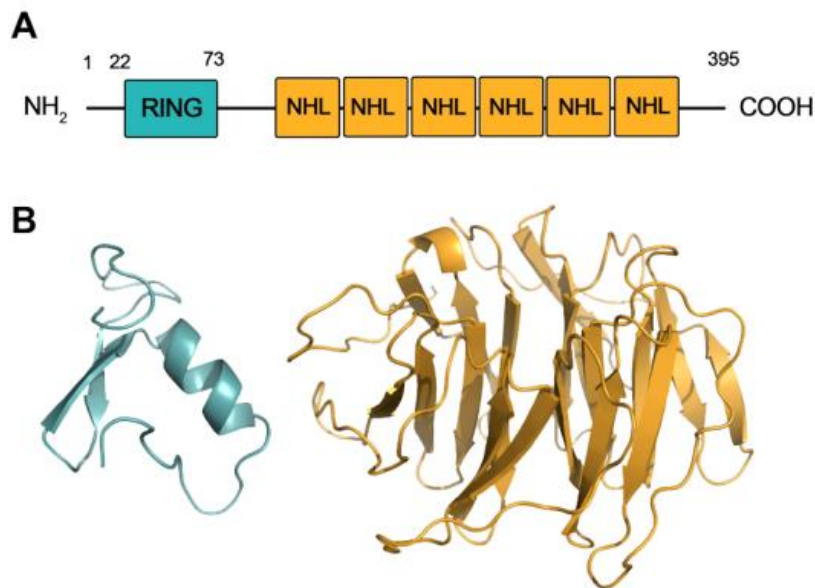


Figura 3: Esquema de la composición de Malina y de su estructura tridimensional.
 A) Se representa tanto el dominio RING en azul, como los 6 dominios NHL en naranja. B) Se esquematiza el dominio RING N-terminal en azul y los dominios NHL C-terminal en naranja (modelo estructural adaptado de Romá-Mateo et al., 2011).

Estos 6 dominios NHL son los encargados de la interacción funcional con Laforina, por lo que la formación del complejo depende de estos dominios. En esta unidad funcional, Laforina es la encargada de entregar los sustratos a Malina para que ésta pueda ejercer su función como E3 ubiquitina-ligasa. De este modo se entiende que Malina es dependiente de Laforina para la realización de su función, al contrario que Laforina que podría tener otras funciones en la célula (Romá-Mateo et al., 2011). Se ha demostrado también que el complejo Laforina/Malina incorpora cadenas de poliubiquitinas ligadas a lisina 63 en la ubiquitina que promueven la degradación autofágica entre otras funciones (Nitschke et al., 2018).

Malina es capaz de interactuar con proteínas relacionadas con el metabolismo del glucógeno como la glucógeno sintasa o la subunidad reguladora de PP1 (proteín phosphatase 1) R5/PTG (encargada de regular la activación y degradación del glucógeno), al igual que Laforina, de modo que una mutación en cualquiera de estas proteínas causaría una desregulación del metabolismo del glucógeno. Su unión está modulada por AMPK (AMP-activated protein kinase), la cual es ubiquitinada por el complejo, y ésta a su vez fosforila R5/PTG. Por tanto, una alteración en alguno de los genes de Laforina o Malina impediría el correcto funcionamiento del mismo, causando una alteración en el control del glucógeno, aumentando su producción y permitiendo su almacenamiento en forma de cuerpos de Lafora en diferentes partes del organismo (principalmente en el cerebro y músculo esquelético) (Romá-Mateo et al., 2011) (Nitschke et al., 2018).

1.2.2 Cuerpos de Lafora

La desregulación en el control de la producción del glucógeno es el causante de su acumulación y la formación de cuerpos de Lafora, y por tanto la principal causa de la enfermedad. El glucógeno está compuesto por glucosa unida por enlaces alfa-1,4-glucosídicos con ramificaciones cada 12 o 14 unidades mediante enlaces alfa-1,6-glucosídicos. El glucógeno se sintetiza mediante la acción cooperativa de tres enzimas, la glucógeno sintasa, la glucogenina y la enzima de ramificación del glucógeno. Un dímero de glucogenina inicia el polímero de glucógeno mediante la autoglucosilación de un residuo conservado de tirosina que da lugar a una cadena alfa-1,4 de

aproximadamente 10 unidades de glucosa. Este oligosacárido permanece unido a la glucogenina y forma un cebador que se convierte en una partícula de glucógeno de tamaño completo por la acción combinada de la glucógeno sintasa y la enzima de ramificación (Gentry et al., 2018).

La estructura de la molécula cobra vital importancia, ya que es esta la que va a determinar la solubilidad o no de la misma y por tanto, su precipitación en forma de cuerpos de Lafora. La frecuencia de ramificación es la clave del proceso y está controlada por la acción de la glucógeno sintasa y la enzima ramificante de glucógeno (Nitschke et al., 2018).

Los cuerpos de Lafora son más parecidos estructuralmente al almidón vegetal, el cual es insoluble, que al glucógeno humano. El almidón es insoluble en agua debido a que sus cadenas son más largas, de entre 15 y 25 unidades de glucosa, y a la presencia de un patrón irregular de ramificación que permite la formación de estructuras en forma de hélice que excluyen el agua (Gentry et al., 2018).

Existen varios tipos de cuerpos de Lafora dependiendo de su localización, por ejemplo los presentes en astrocitos son polimórficos, forman agrupaciones y colocalizan con marcadores de astrocitos. En cambio los presentes en neuronas suelen ser más redondeados y grandes, se encuentran aislados sin formar agrupaciones y colocalizan con marcadores de neuronas (Duran et al., 2021). En la **Figura 4** se pueden observar las diferentes morfologías de los cuerpos de Lafora, no solo en cerebro sino en músculo esquelético y corazón, además de su comparación con almidón.

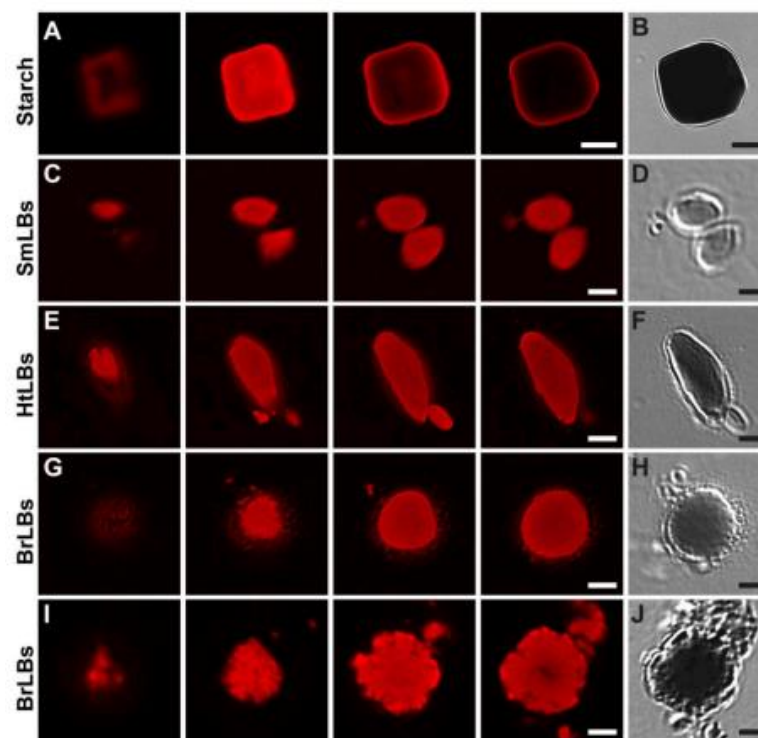


Figura 4: Representación morfológica de los cuerpos de Lafora según su localización y comparación con el almidón. A y B) Almidón. C y D) Cuerpos de Lafora pertenecientes al músculo esquelético. E y F) Cuerpos de Lafora obtenidos del corazón. G, I) Cuerpos de Lafora extraídos de cerebro. A, C, E, G, I obtenidas mediante tinción con yodo y B, D, F, H, J obtenidas mediante contraste de interferencia diferencial (DIC) (Brewer, Putaux, et al., 2020) (Figura extraída de Brewer et al., 2020).

Se ha demostrado en ratones con deficiencia tanto de Laforina como de Malina, que el glucógeno que se produce posee ciertas anormalidades y que presentan sustancialmente cadenas más largas, sugiriendo un papel del complejo Laforina/Malina en la elongación del polímero. También se conoce que laforina es capaz de eliminar el fosfato del glucógeno permitiendo la degradación completa de la molécula por parte de la glucógeno fosforilasa y la enzima desramificante. De esta forma queda demostrado que el complejo interviene tanto inicialmente, en la formación del glucógeno, como en su degradación haciendo posible el proceso de eliminación (Nitschke et al., 2018).

Por lo que respecta a la degradación del glucógeno, se conoce también que el complejo es capaz de interactuar con p62, componente perteneciente al proceso de autofagia y que se encuentra alterado en la enfermedad. El glucógeno es degradado gracias a la acción de la glucógeno fosforilasa y la enzima desramificante, pero recientemente se ha descrito un proceso de degradación conocido como “glucofagia”, en el cual el glucógeno sería dirigido a los lisosomas para degradación. La interacción del complejo con p62 y este tipo de eliminación del glucógeno podría verse afectado en la enfermedad, aunque esta hipótesis requiere de futuros estudios (Gentry et al., 2018) (Nitschke et al., 2018).

1.3 Alteraciones en la enfermedad de Lafora

En la enfermedad de Lafora, aparte de existir una desregulación del metabolismo del glucógeno, se encuentran alteradas otras rutas o sistemas como la autofagia, mencionada anteriormente, la expresión de proteínas de respuesta a choque térmico, aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Durante los últimos años se ha caracterizado que en la enfermedad de Lafora, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, tiene lugar un proceso neuroinflamatorio que se manifiesta como una característica clave en los modelos animales murinos de la enfermedad. En este proceso interviene la microglía y los astrocitos, que son los responsables de la neurodegeneración que muestra la patología.

1.3.1 Neuroinflamación

Estudios transcriptómicos en modelos murinos de la enfermedad demuestran la existencia de astrogliosis y microgliosis reactiva a partir de los tres meses de edad, compaginado con una regulación al alza de mediadores inflamatorios como CCL4, CCL5 o CXCL10. Con el tiempo también se produce liberación de citoquinas como TNF- α o IL-1 β , factores del sistema del complemento (C1q y C3), radicales libres y otros mediadores del sistema inmunitario. También se produce la regulación positiva de genes relacionados con el metabolismo lipídico, del fagosoma o del complejo mayor de histocompatibilidad (Lahuerta et al., 2020).

Se sabe que la acumulación de cuerpos de Lafora en astrocitos es la responsable de la activación de las células de la glía, desencadenando una respuesta inflamatoria crónica dañando la homeostasis celular de las neuronas y obteniendo características neurotóxicas como la liberación de grandes cantidades de radicales libres y una menor producción de antioxidantes. Por otro lado, uno de los aspectos más importantes de los astrocitos con respecto a la homeostasis neuronal es el reciclaje de K⁺ y glutamato derivado de la actividad de las neuronas. Para ello utilizan el canal Kir4.1 y el transportador EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter 2). En la enfermedad de Lafora ambos componentes se encuentran alterados, pero de forma más severa el transportador EAAT2, contribuyendo a un aumento de la excitabilidad hasta el punto en el cual se produce excitotoxicidad y la muerte celular (Perez-Jimenez et al., 2021).

La desregulación se puede producir debido a la propia acumulación de glucógeno en los astrocitos ya que estos procesos dependen de la glucogenólisis. Asimismo, también puede provenir de la secreción de citoquinas proinflamatorias liberadas por la glía, reduciendo la toma de glutamato a través de EAAT2 y promoviendo su liberación. Por último, el propio transportador es sustrato del complejo Laforina/Malina, por lo que una alteración del mismo provoca un mal funcionamiento del mismo impidiendo su translocación a la membrana (Perez-Jimenez et al., 2021). La falta de reciclado de la sinapsis neuronal produciría un aumento en la excitabilidad desencadenando los ataques de epilepsia tan característicos de la patología.

La liberación continua y general de quimiocinas observada en modelos animales estarían favoreciendo la infiltración en el tejido cerebral de células del sistema inmunitario, principalmente linfocitos, contribuyendo al mantenimiento de la inflamación y por tanto a la neurodegeneración. Además, citoquinas como TNF- α o IL-1 β inducen un aumento en la expresión de transportadores de hierro promoviendo su acumulación en astrocitos y microglía generando y aumentando la inflamación (Della Vecchia et al., 2022) (Rubio et al., 2023).

1.4 Tratamientos actuales y perspectivas futuras

Actualmente la enfermedad de Lafora no tiene cura y resulta fatal. Los tratamientos existentes, como el uso de antiepilépticos, tienen como objetivo el retraso del progreso de los síntomas que causa la patología. Es por ese motivo que han surgido novedosas terapias experimentales las cuales tienen un gran potencial futuro.

Una de las terapias propuestas es el uso de proteínas de fusión que estarían formadas por un dominio de anticuerpo fusionado a una enzima degradadora de glucógeno mediante un péptido enlazador, capaces de reconocer los cuerpos de Lafora y degradarlos enzimáticamente. Un ejemplo sería el uso de AEF VAL-0417, una proteína de fusión formada por el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal 3E10 (capaz de penetrar en neuronas) y la enzima α -amilasa pancreática humana capaz de degradar los cuerpos de Lafora (Austin et al., 2020) (Brewer, Uittenbogaard, et al., 2020).

Otro enfoque que se está estudiando es la paralización en la producción de glucógeno a través de la inhibición de la glucógeno sintasa (GS). En algunos modelos animales de la enfermedad de Lafora se ha podido recuperar el fenotipo silvestre inhibiendo a la GS desde el inicio de la vida del ratón. Hasta la fecha, no se disponía de información sobre la afectación de la inhibición en ratones adultos, pero en recientes estudios se ha demostrado la posibilidad de restaurar el fenotipo original en músculo y de la paralización en la acumulación de cuerpos de Lafora en cerebro. Solo con una intervención temprana en el modelo adulto de la enfermedad es posible recapitular y obtener niveles normales de acumulación en el cerebro. También se ha demostrado que la supresión de la glucógeno sintasa no es suficiente para prevenir la neuroinflamación que se produce (Varea et al., 2022).

El reposicionamiento de fármacos también es una estrategia que ha tomado impulso recientemente. En este caso se usan fármacos aprobados para su uso en una enfermedad en concreto, pero que pueden tener efectos beneficiosos en otras patologías. Un ejemplo de ello sería la Metformina, el cual ha demostrado enlentecer el progreso de la enfermedad en un estadios tempranos no sólo en modelos animales (Berthier et al., 2016), sino en pacientes humanos, provocando una gran mejoría en la capacidad de habla de los pacientes (Burgos et al., 2022)(Sanz et al., 2021).

Durante los últimos años el uso de lipocomplejos como método de transporte y liberación de fármacos, así como método de transfección para el tratamiento genético de diferentes enfermedades, ha cobrado gran relevancia en investigación. El campo de las enfermedades raras también ha hecho uso de esta tecnología y recientes estudios avalan el uso de lipocomplejos catiónicos de DLinDMA ($C_{41}H_{77}NO_2$) combinados con el gen de Laforina (*EMP2A*) para el tratamiento de la enfermedad de Lafora en cultivos celulares (Vemana et al., 2021). El uso de nanolipocomplejos de DLinDMA demostró poseer buenas características fisicoquímicas, presentar una hemólisis despreciable y una citotoxicidad mínima. Además el estudio también muestra una eficacia de transfección adecuada y posteriores ensayos corroboran la buena expresión de *EPM2A* y una correcta actividad de laforina (Figura 5). Los ensayos fueron realizados tanto en células de la línea HEK293 (human embryonic kidney) como en la línea SK-N-SH (human neuroblastoma)(Vemana et al., 2021).

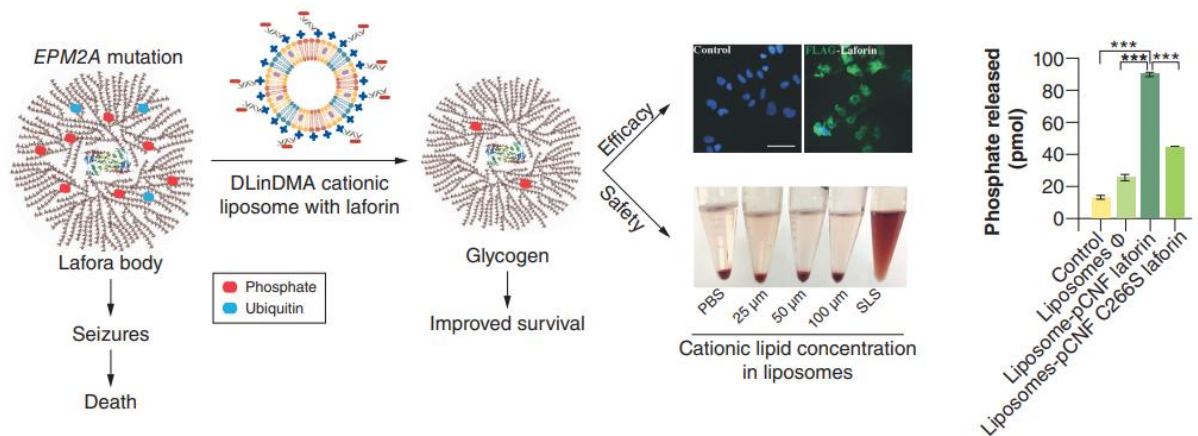


Figura 5: Esquema resumen del procedimiento seguido para la realización del estudio. En la Figura se muestra tanto la hipótesis del proyecto, como la seguridad y eficacia obtenida tras el procedimiento experimental (figura extraída de Vemana et al., 2021).

Aunque se han realizado grandes avances en la investigación de tratamientos en la enfermedad de Lafora, todavía son necesarios grandes esfuerzos por llevarlos a término, además de la necesidad de la continua investigación de nuevos tratamientos, así como el descubrimiento de posibles nuevas dianas terapéuticas para la patología.

1.5 Experimento de ubiquitinación de alto rendimiento

Existe una amplia variedad de estudios y bibliografía sobre las manifestaciones clínicas y las alteraciones causadas por la enfermedad, pero mayoritariamente se desconocen los mecanismos o intermediarios concretos por los que se producen. Es por ello que con el fin de conocer nuevos sustratos fisiológicos que reciben ubiquitinación por parte del complejo Laforina/Malina, el grupo dirigido por el Dr. Pascual Sanz en colaboración con el grupo liderado por Dr. Ugo Mayor, sabiendo que Malina es una E3-ubiquitin ligasa y que por esta razón puede asociarse la enfermedad con el sistema de degradación mediado por ubiquitina, realizó un ensayo de ubiquitinación de alto rendimiento con el fin de conocer los sustratos que son ubiquitinados por Malina. El ensayo se realizó en la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) la cual expresaba una versión silvestre

de *EPM2B* u otra asociada a la patología carente de funcionalidad, la variante P69A, y que es la más frecuente entre los afectados por la enfermedad de Lafora.

Tras la realización del ensayo, la obtención de los resultados y su procesamiento, una de las proteínas que mayor nivel de ubiquitinación mostraba entre los candidatos obtenidos era HspA1L. Ésta se encontraba entre las que presentaban una mayor diferencia entre el grado de ubiquitinación de la forma activa de la Malina silvestre frente a la mutante inactiva y por otra parte, es una chaperona perteneciente al grupo de proteínas de choque térmico, responsables esenciales del control de la proteostasis de la célula.

1.5.1 Chaperonas y la familia Hsp70

Previamente al plegamiento completo de las proteínas o a la desnaturalización de las mismas, los residuos hidrofóbicos que normalmente se localizan en el interior de la estructura proteica quedan expuestos al ambiente acuoso del citoplasma y son propensos a agregarse o sufrir un plegamiento incorrecto, momento preciso en el cual actúan las chaperonas moleculares. Este concepto engloba a un gran y diverso grupo de proteínas altamente conservadas que interactúan de forma temporal con cadenas de polipéptidos parcialmente plegados durante el desarrollo normal de la célula y en eventos como el transporte, la translocación y el desensamblaje de complejos proteicos (Cox & Johnson, 2018). Estas no cambian estructuralmente las proteínas a las que asisten, ni forman parte de ellas, sino que actúan en esas zonas proclives velando por un correcto plegamiento (Dahiya & Buchner, 2019).

Las chaperonas pueden clasificarse en diferentes grupos según su homología de secuencia, o en base a su peso molecular, entre otras características. Siendo esta última la más extendida y la que mayor uso tiene, proporciona los siguientes grupos: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 y las Hsp (Heat Shock Proteins) pequeñas (Kim et al., 2013). HspA1L forma parte del grupo de las Hsp70. Este grupo es esencial en todos los eucariotas, ayuda en un gran número de procesos de plegamiento de proteínas, incluyendo el plegamiento *de novo*, el correcto plegamiento de proteínas mal plegadas, solubilización de agregados proteicos, la degradación de proteínas, la translocación de proteínas a través de membranas, ensamblaje, el montaje y desmontaje de complejos oligoméricos o la regulación de la estabilidad y actividad de ciertas proteínas plegadas de forma nativa. Se expresan tanto constitutivamente como bajo inducción por choque térmico, estrés oxidativo o agentes químicos dañinos (M. P. Mayer & Bukau, 2005) (Kowalczyk et al., 2018).

La gran versatilidad de esta familia de proteínas es que a diferencia de otras familias en las que sus componentes envuelven por completo o parcialmente a sus sustratos, las Hsp70 se unen solo a un corto segmento de sus polipéptidos diana a través de su dominio de unión (SBD/substrate-binding domain) situado en el extremo C-terminal. De esta forma su actividad no se ve limitada por el tamaño de sus sustratos, que además se ve regulada por el estado conformacional del dominio de unión a nucleótidos situado en el extremo N-terminal (Matthias P. Mayer, 2010) (M. P. Mayer & Bukau, 2005).

La actividad se ve regulada de la siguiente manera: si la Hsp70 se encuentra unida a ATP las tasas de asociación o intercambio son altas, pero la afinidad por sus sustratos es baja. En cambio, si se encuentra unido a ADP o no tiene un nucleótido adherido es todo lo contrario, la afinidad por los sustratos es muy alta pero las tasas de intercambio son muy bajas. Este ciclo conformacional aumenta la afinidad aparente de Hsp70 por sustratos en función de lo requerido. Además se ha propuesto que el ciclo de las Hsp70 está relacionado con cambios conformacionales que pueden actuar como fuerza de tracción para translocar polipéptidos durante la importación a las

mitocondrias o al retículo endoplásmico. En la **Figura 6** queda expuesto el mecanismo del ciclo y la estructura terciaria de la proteína (Matthias P. Mayer, 2010)(M. P. Mayer & Bukau, 2005).

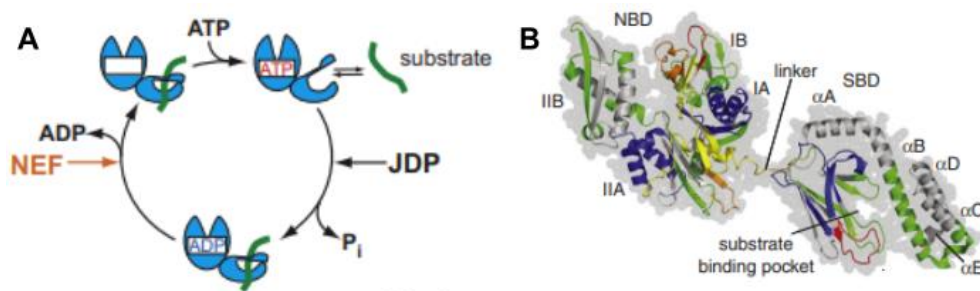


Figura 6: Esquema del ciclo de actividad de las Hsp70 y estructura genérica de la familia. A) Resumen visual del funcionamiento del ciclo conformacional de las Hsp70 en función de su unión a ADP o ATP. B) Estructura terciaria general de la familia en la que se puede observar ambos dominios presentes en las proteínas, el dominio de unión a nucleótidos (NBD) y el dominio de unión a sustratos (SBD) (Figura extraída y modificada de Matthias P. Mayer, 2010).

1.6 Chaperonas y la enfermedad de Lafora

La relación que infiere el ensayo de ubiquitinación entre las chaperonas y el complejo Laforina/Malina no es algo ajeno a la literatura actual, sino que existen diversos estudios en los que se evidencia una interacción entre chaperonas y Malina o Laforina.

Se ha visto que en biopsias de cerebro de pacientes de la enfermedad de Lafora existe un reclutamiento de chaperonas como Hsc70/Hsp70 hacia los cuerpos de Lafora (Rao et al., 2010). En modelos animales también se observan este tipo de eventos en los que se ven reclutados hacia los cuerpos de Lafora ciertas chaperonas, como por ejemplo Grp78/Bip perteneciente a la familia HspA y que se encuentra normalmente en el retículo endoplasmático (Puri et al., 2012). Este hecho respondería a los intentos de las células de reparar o retirar los agregados que se acumulan a causa de la patología, como consecuencia a los diferentes tipos de estrés que padecen las células.

Dado que los cuerpos de Lafora también están formados por la agregación de la propia Malina mutante, se estudió el papel que juegan estas chaperonas con respecto a la protección que proporcionan en la línea celular Cos-7 (línea celular tipo fibroblasto de riñón de mono verde africano). Se vio que, a parte del reclutamiento hacia los agregados, se inducía una mayor expresión de las chaperonas en aquellas células que expresaban la Malina mutante (delF216_D233). Además cuando se cotransfectaba Hsp70 junto con el mutante de Malina, la sobreexpresión de la chaperona protegía de forma significativa a las células de la muerte inducida por la Malina mutante y la aparición de dichos agregados (Rao et al., 2010).

Otro ámbito de estudio de chaperonas en la enfermedad de Lafora es la respuesta a estrés térmico. Se ha observado que la ausencia de uno de los dos componentes del complejo causa una desregulación de la respuesta a choque térmico. Esto es debido a que CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*), uno de los principales actores de la respuesta, forma un complejo junto a Malina y Laforina y no es traslocado al núcleo en ausencia de cualquiera de éstas. Esta interacción es tan esencial que la pérdida de Malina o Laforina es comparable al silenciamiento de CHIP en lo que respecta a muerte celular inducida por choque térmico, mostrando así el importante papel que tienen Malina y Laforina en este tipo de respuesta (Sengupta et al., 2011).

Es conocido que tanto Malina como Laforina interactúan con CHIP y con Hsf1 (Heat shock factor 1) y que durante la respuesta a estrés térmico, CHIP activa la transcripción de Hsf1 (Dai et al., 2003). Hsf1 es uno de los principales factores de transcripción de las proteínas de respuesta a este estrés, por lo que la falta de Malina o Laforina podría afectar a la expresión de cualquiera de los genes diana de Hsf1, entre ellos Hsp70. Se ha demostrado que se produce una reducción significativa de los niveles de Hsp70 tras choque térmico en células con silenciamientos tanto de Malina como de Laforina sugiriendo que el complejo Laforina/Malina regula la inducción mediada por Hsf1 del gen Hsp70. Con el objetivo de reforzar este hecho, se estudió la actividad del promotor de Hsp70 bajo condiciones de estrés térmico en ausencia de Malina y Laforina. El silenciamiento de ambas proteínas causaba una reducción significativa de la actividad del promotor bajo condiciones de estrés en comparación con los controles, sugiriendo que Hsf1 requiere de Malina y Laforina para su activación bajo condiciones de choque térmico (Sengupta et al., 2011).

Por otro lado, en condiciones normales, la sobreexpresión de Malina y CHIP causan un aumento en los niveles de Hsp70, mientras que la sobreexpresión de la variante mutante (E91K) no producía ninguna alteración significativa. En cambio cuando se inducía la sobreexpresión de Laforina no se detectaba un aumento en los niveles de Hsp70, aunque su ausencia sí que causaba una disminución de la actividad del promotor cuando ésta es mediada por Malina o CHIP, indicando que las tres proteínas (Malina, Laforina y CHIP) son esenciales en la activación de Hsf1 y por tanto en la expresión de proteínas contra el estrés térmico (Sengupta et al., 2011). Además se ha comprobado en ratones *knockout* tanto para Malina como para Laforina, que los niveles de expresión de Hsf1 se ven considerablemente reducidos, al igual que otras dianas de este factor como Hsp60 y Hsp40 (Sinha et al., 2021).

1.7 HspA1L

Una de las proteínas pertenecientes a la familia Hsp70 es la HspA1L, que junto a HspA1A y HspA1B son las tres proteínas de esta familia que se codifican en la región del complejo mayor de histocompatibilidad clase III. HspA1L se encuentra formada por 641 aminoácidos, tiene un tamaño molecular de 71.6 kDa y dos dominios característicos de la familia, un dominio de unión a sustrato (SBD) y otro dominio de unión a nucleótidos (NBD).

Las Hsp70 constituyen un grupo de 13 proteínas altamente conservadas evolutivamente. Además presentan un alto grado de homología (91% entre HspA1L y HspA1A), aunque se ha demostrado que cada miembro tiene actividades específicas y la diferencia en sus diferentes funciones podría venir dada por los NEFs (nucleotide-exchange factors) que se unen a estas (Serlidaki et al., 2020) (Kowalczyk et al., 2018) (Nakatsuka et al., 2021).

HspA1L a diferencia de HspA1A y HspA1B muestra una expresión constitutiva y no inducible por estímulos externos. Principalmente se expresa de manera significativa en los testículos, pero también muestra expresión en otros lugares del cuerpo como las trompas de Falopio y el ovario en la mujer, músculo esquelético y cardíaco, tejidos endocrinos y tejido cerebral, mayoritariamente en el cerebelo, materia blanca y tálamo. En cuanto a las líneas celulares, si nos centramos en el cerebro y de mayor a menor expresión, las principales células que expresan son los astrocitos, luego microglía y posteriormente oligodendrocitos. Estos datos de expresión quedan resumidos en la **Figura 7**.

Este patrón de expresión de la HspA1L muestra gran similitud con el patrón de aparición de los cuerpos de Lafora, tanto en los diferentes órganos, como en las líneas celulares en las que se expresa la proteína. De esta manera se puede intuir una posible relación o interacción entre la HspA1L y el complejo Laforina/Malina en esas localizaciones.

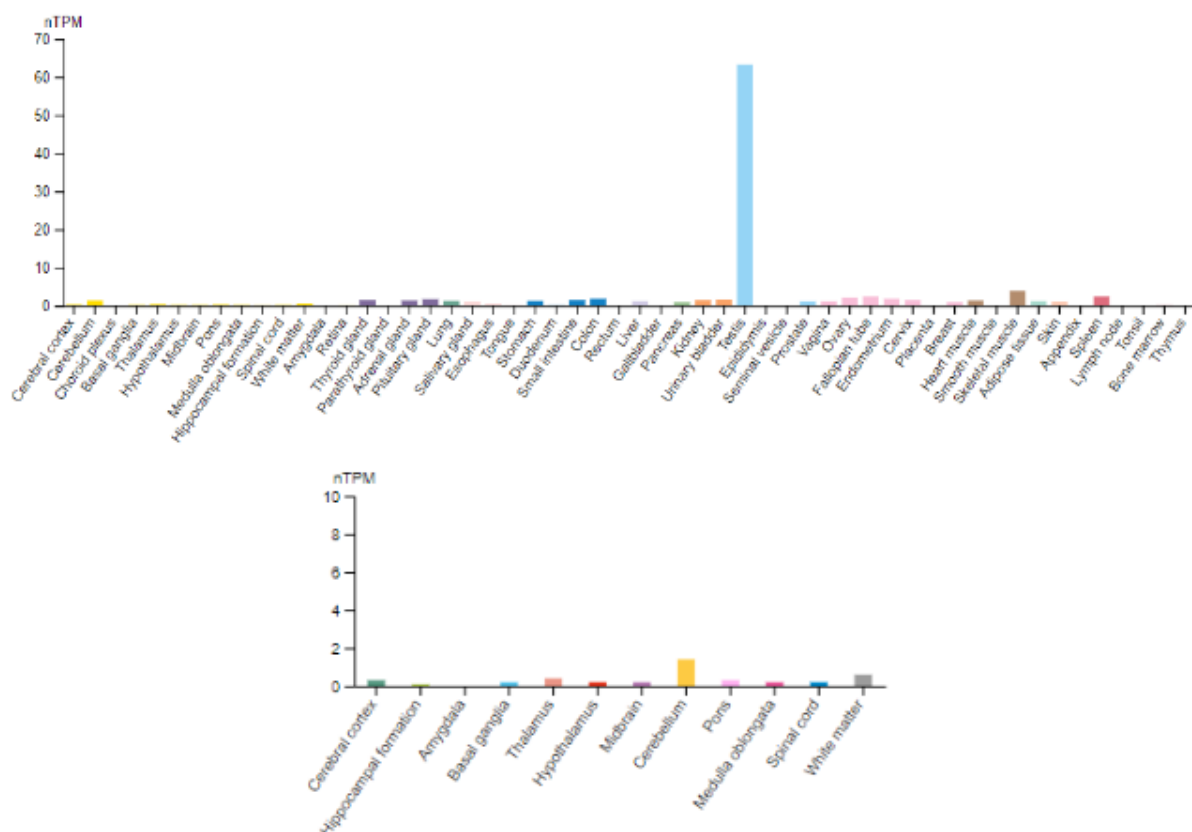


Figura 7: Datos consensuados y normalizados de expresión de HspA1L. El código de color utilizado para la presentación de esta figura se basa en las características funcionales similares que presentan cada tejido y sistema en el que se encuentra. A) Expresión según el órgano del cuerpo. B) Expresión de la proteína en las diferentes partes del cerebro (The Human Protein Atlas, 2020).

Por lo que respecta a su localización subcelular inicialmente y de forma mayoritaria se localiza a HspA1L en el citoplasma, aunque en recientes estudios también se localiza en el núcleo celular, en el exterior y en la membrana celular. Un ejemplo de localización nuclear de HspA1L es el de la regulación de la transcripción de β -Catenina en ambientes tumorigénicos potenciando las propiedades de células madre cancerígenas (CSC) (Choi et al., 2020). En cuanto a su localización extracelular, se ha demostrado su liberación por parte de macrófagos M1 en células de osteosarcoma, en las que tiene un efecto antitumoral. En ese mismo estudio se muestra la capacidad de HspA1L de provocar un efecto contrario al mostrado cuando no se produce su secreción al exterior celular y se mantiene la localización citoplasmática, en la que previene la apoptosis y potencia la aparición de tumores (Li et al., 2022). De estos estudios se puede deducir que dependiendo de su localización celular la funcionalidad de HspA1L puede ser completamente diferente.

El estudio de esta proteína se extiende al campo de las enfermedades neurológicas, neurodegenerativas y psiquiátricas. Una de ellas es la enfermedad de Parkinson, la cual tiene asociadas proteínas como PINK1 (serina/treonina quinasa) y Parkina (E3-ubiquitin ligasa). El estrés oxidativo tiene un papel principal en este tipo de enfermedades y es por ello por lo que se busca el origen y el tratamiento del mismo. Recientemente se ha observado que el uso de melatonina incrementa los niveles de HspA1L, la cual a su vez estabiliza la unión de Parkina a la membrana mitocondrial facilitando la mitofagia y la renovación de las mitocondrias, protegiendo de esta forma a las células del estrés oxidativo (Yoon et al., 2019).

2. Hipótesis y objetivos

El principal objetivo de este trabajo es la validación de que la chaperona HspA1L, perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico Hsp70, muestra una ubiquitinación diferencial por Malina, además de la comprobación de la interacción directa entre HspA1L y los componentes del complejo Laforina/Malina. Este objetivo principal consta de los siguientes puntos:

1. Validación mediante la simulación de las condiciones silvestre y patológica (Malina P69A) de la ubiquitinación diferencial de HspA1L mediante ensayos de ubiquitinación en la línea celular HEK293.
2. Determinación mediante ensayos de ubiquitinación en la línea celular HEK293 de la topología de unión de la ubiquitina que transfiere el complejo Laforina/Malina a HspA1L.
3. Determinación de la necesidad de un complejo funcional y completo para la ubiquitinación de HspA1L.
4. Estudio de la interacción directa de HspA1L con los componentes del complejo Laforina/Malina realizando ensayos de inmutaafinidad por "GFP-TRAP" en la línea celular HEK293.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

La línea celular utilizada en este trabajo, tanto para el ensayo de ubiquitinación como para el GFP-TRAP, ha sido HEK293 (Human Embryonic Kidney, ATCC). Para uno de los ensayos de ubiquitinación se utilizó una línea celular HEK293 modificada a través de la herramienta CRISPR, en la que el gen *EPM2A* codificante de laforina se encuentra mutado expresando la forma patogénica R241X. Las células fueron manipuladas bajo campana de bioseguridad tipo II y adquiridas a través de la ATCC (American Type Culture Collection).

Para el buen desarrollo y crecimiento del cultivo celular, las células fueron incubadas en un ambiente húmedo a 37 °C de temperatura y a una concentración del 5% de CO₂ en incubador. Se utilizó el medio de crecimiento o cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), el cual se suplementaba con 25mM de glucosa, 10% de suero bovino fetal (FBS) y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina + 100µg/mL de estreptomina). Cuando se alcanzaba la máxima confluencia en placa, los pases celulares se llevaban a cabo realizando un primer lavado con PBS (NaCl 136.9mM + Na₂HPO₄ 16mM + KH₂PO₄ 1.47mM + KCl 2.68mM pH7.2) previamente calentado a 37 °C en baño de agua y posteriormente se procedía a tripsinizar el cultivo (Tripsina-EDTA: 200 mg/mL Versene [EDTA], 500 mg/L Tripsina 1:250, Lonza) durante 3 minutos, tras este periodo de tiempo se añadía medio de cultivo paralizando la reacción. Las células se recuperaban mediante centrifugación a 1400 rpm durante 5 minutos, volviendo a sembrarlas en nuevas placas con medio fresco.

El material estéril de plástico necesario para el manejo y sembrado de las células fue obtenido de la casa comercial Sarstedt.

3.2 Extracción de plásmidos

En los diferentes ensayos de ubiquitinación fue necesario el uso de plásmidos con el fin de expresar o sobreexpresar las proteínas en la línea celular HEK293. Los plásmidos utilizados quedan resumidos en la **Tabla 1**:

Tabla 1: Plásmidos utilizados en la realización del proyecto

	PROTEÍNA/MARCA	PLÁSMIDO
1	Ubiquitina	pCMV-UBI/WT
2	Ubiquitina	pBssk-6His-UBI
3	HspA1L	pCMV-HA-HspA1L
4	Laforina WT	pFLAG-Laforina
5	Malina WT	pFLAG-6B-Malin WT
6	Malina P69A	pFLAG-Malin P69A
7	FLAG	pcDNA3-FLAG-Vacío
8	HA	pcDNA3-HA-Vacío
9	GFP-Malina	pEGFP-C2-Malina
10	GFP-Malina P69A	pGFP-Malina P69A
11	CFP-Laforina	pECFP-N1-Laforina
12	GFP	pEGFP-C1
13	CFP	pEMPTY-CFP

Para la obtención de todos los plásmidos utilizados se utilizó el kit de purificación de ADN *Plasmid DNA Purification* (NucleoBond Xtra Midi/Maxi) de Takara Bio.

Para la amplificación y obtención de todos los plásmidos fue necesario refrescar el glicerinado de almacenaje de cada uno de ellos bajo cabina de bioseguridad. Posteriormente se procedió a su siembra en triple estría de las bacterias que los contienen en placas con el antibiótico de selección pertinente para cada uno de ellos. A continuación se dejó incubar toda la noche en un incubador a 37°C. Una vez las colonias han crecido, se seleccionan aquellas que se encuentren aisladas y tengan un tamaño reducido y se traspasan a un matraz Erlenmeyer de 500mL en el que previamente se han adicionado 200mL de medio líquido LB (Luria Bertani) y una dilución 1/1000 del antibiótico correspondiente, dejando incubar la mezcla durante la noche a 37°C en un incubador rotatorio.

Tras el periodo de incubación se trasvasa el cultivo a un recipiente de centrifugación, centrifugando 15 minutos a 4.500 x g a 4°C. Una vez se obtuvo el pellet bacteriano, se retiró el sobrenadante, se añadió el tampón de resuspensión y se agitó mediante vortex para homogeneizar el pellet completamente, dejándolo reposar 5 minutos. Posteriormente se procedió al equilibrado de la columna de filtrado en la cual se va a separar el ADN de los restos celulares, para ello se adicionaron 12mL de tampón de equilibrado sobre la columna. Una vez equilibrada, se procedió a la lisis del pellet celular mediante 8mL de tampón de lisis dejando incubar 5 minutos, tras los cuales se añadieron 8mL de tampón de neutralización. A continuación se cargó el lisado en la columna y se realizó el primer lavado con tampón de equilibrado, se descartó la columna y se realizó un segundo lavado con tampón de lavado. El siguiente paso consistió en la elución del ADN para lo cual se utilizó 5mL de tampón de elución que fue recolectado en un tubo falcon de 50mL. Por último se usó isopropanol al 10% para la precipitación del material genético, etanol al 2% para su lavado y secado, y finalmente, la solución fue almacenada en buffer de redisolución TE-EF (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA1 mM) para su cuantificación y uso en los diversos ensayos del trabajo.

3.3 Transfección de cultivos celulares

En función del ensayo, los cultivos de HEK293 fueron transfectados con diferentes combinaciones de plásmidos según la finalidad del mismo. Para un proceso óptimo, la confluencia celular utilizada en la transfección fue de un 80% - 90% y se siguieron las indicaciones del fabricante (Roche) del reactivo de transfección *X-treme GENE HP Transfection reagent*, siendo la relación requerida entre el reactivo y la cantidad de material genético a transfectar de 2µL:1µg. Tanto los plásmidos como el reactivo de transfección fueron diluidos en medio OPTIMEM con el objetivo de aumentar la eficacia de la transfección. Fue necesario un periodo de incubación de entre 24h - 48h para una expresión óptima de las proteínas.

3.4 Cuantificación de proteína mediante Bradford

La cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) (*Dc Protein Assay*, Bio-Rad) es una reacción basada en una variación colorimétrica del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, debida a la interacción entre el colorante y la proteína presente en el medio. En un medio ácido, el colorante se encuentra de 3 formas diferentes: catiónico (naranja), aniónico (azul) o neutro (verde). Cuando la proteína es añadida junto con el reactivo, la interacción entre ambos produce la estabilización de la forma aniónica del colorante produciendo un cambio de color, de un

tono marrón a un tono azulado. El cambio de intensidad en la tonalidad dependerá de la cantidad de proteína presente en la dilución.

Para conocer las cantidades exactas de proteína que se encuentran en las muestras, se utiliza una dilución 1:5 del reactivo de Bradford y se estableció la siguiente curva patrón mediante la utilización de cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA): 0 µg, 0.5 µg, 1 µg, 1.5 µg, 2 µg, 2.5 µg, 3 µg, 3.5 µg, 4 µg, 5 µg y 6µg. Como blanco o punto 0µg se utiliza el tampón requerido para la extracción en los diferentes ensayos. Las mediciones se realizaban en el espectrofotómetro *Ultrospec 2000 Spectrophotometer* (Pharmacia Biotech).

3.5 Ensayo de ubiquitinación

La finalidad de este ensayo es la obtención o purificación de aquellas proteínas que han sido ubiquitinadas por parte de la célula. Para ello se utiliza una resina de cobalto TALON (Clontech), la cual tiene una alta afinidad por colas de histidinas. Las colas de histidina necesarias se encuentran fusionadas a la ubiquitina (6xHis-UBI) en un plásmido el cual se transfecta junto con la combinación asignada a cada condición, de forma que cuando se exprese, las proteínas que la contengan quedarán retenidas por la resina permitiéndonos observar si las proteínas de interés han sido ubiquitinadas en la célula.

Para la obtención del extracto proteico se retiró el medio de las placas y se lavó 2 veces con PBS. Se añadieron 400µL - 500µL de tampón A o de lisis (Cloruro de guanidinio 6M, Na₃PO₄ 0.1M, Tris-HCl 0.1M pH8) a las placas, dependiendo de la confluencia de las mismas. Se procedió al raspado de las mismas para obtener el lisado que fue posteriormente homogeneizado mediante jeringuillas 25G x 5/8" (1mL). Por último, se centrifugaron las suspensiones durante 15 minutos a 12.000 x g.

A continuación, es necesario equilibrar la resina de TALON con tampón B (Cloruro de guanidinio 6M, Na₃PO₄ 0.1M pH8, Tris-HCl 0.1M pH8 e imidazol 10mM). Se requiere de 150µL de resina por condición, que fueron centrifugados a 800 x g durante dos minutos. Se retiró el sobrenadante, se reemplazó con 1mL de tampón B y se centrifugó 2 minutos a 800 x g, repitiendo el lavado 2 veces. Una vez la resina ha sido equilibrada, se añadió el volumen necesario para realizar el reparto de la resina de forma equitativa para cada condición. Finalmente, se realizó un último centrifugado para retirar el tampón B dejando únicamente la resina sobre la que posteriormente se añadirán las muestras.

Como última parte del ensayo, se cuantificaron las muestras mediante el método de Bradford y se añadieron 2mg de cada extracto junto con 100µL de tampón A' (Cloruro de guanidinio 6M, Na₃PO₄ 0.1M, Tris-HCl 0.1M pH8 e imidazol 0.1M) y el volumen necesario de tampón A hasta completar 1mL. Las muestras con los extractos y la resina se incubaron durante 3h en rotación a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 800 x g durante 1 minuto para eliminar el sobrenadante. Se añadió 1 mL de tampón B y se dejó 15 minutos en rotación. Tras este primer lavado se volvió a centrifugar 1 minuto a 800 x g y se realizaron 3 lavados más de 15 minutos en rotación con el tampón C (Urea 8M, Na₃PO₄ 0.1M pH8, Tris-HCl 0.1M pH8 e imidazol 0.1M) centrifugando 1 minuto entre cada lavado. Después se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 120µL de SB 2X por muestra, se hiervió a 95°C durante 5 minutos y se congelaron para su posterior uso y análisis por western blot.

3.6 Ensayo de inmunoafinidad por GFP (GFP-TRAP)

Este tipo de ensayo tiene como finalidad la comprobación de la interacción entre proteínas de interés, para ello se utiliza una resina de agarosa de 90µm de diámetro donde se hayan unido covalentemente anticuerpos específicos dirigidos contra GFP (*Green fluorescent protein*). De esta forma, todas aquellas proteínas que tengan fusionadas GFP a su estructura quedarán retenidas por la resina y con ellas todas aquellas que interactúen de forma directa con estas.

El extracto se obtuvo mediante la adición de 400µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10mM pH7.5, NaCl 300mM, EDTA 0.5mM, Glicerol al 2.5%, NaF 2.5mM, Na₃VO₄ 0.5mM, Na₄P₂O₇ 2.5mM, PMSF 1mM, NP-40 al 0.25% e inhibidores de proteasas [Roche]) a las placas de cultivo. Se utilizaron raspadores para obtener la máxima cantidad de lisado posible y posteriormente se homogeneizaron las muestras con una jeringuilla de 25G x 5/8" mezclando 5 veces cada 10 minutos 3 veces. Se centrifugaron los lisados a 17.000 x g durante 10 minutos, descartando el pellet y cuantificando el sobrenadante mediante el método de Bradford.

La resina debe ser equilibrada previamente a la realización del ensayo. Son necesarios 25µL de resina por muestra, completando hasta 1.5mL de volumen total con tampón de lavado (Tris-HCl 10mM pH7.5, NaCl 300mM, EDTA 0.5mM, Glicerol al 2.5%, NaF 2.5mM, Na₃VO₄ 0.5mM, Na₄P₂O₇ 2.5mM e inhibidores de proteasas [Roche]), centrifugando a 2500 x g durante 5 minutos. El equilibrado se realizó 2 veces y en el último centrifugado se eliminó el sobrenadante para añadir tampón suficiente como para repartir la resina a cada muestra de forma homogénea. Se realizó un último centrifugado para eliminar el sobrenadante y obtener únicamente la resina sobre la cual se añadirán las muestras.

Se utilizaron entre 1mg y 2mg, según la concentración de los extractos, completando hasta 1mL con tampón de lavado para cada condición y se dejaron en rotación durante 1h. Tras finalizar este periodo, se recogieron las muestras y se centrifugaron a 2500 x g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Las muestras se lavaron 3 veces con 1mL de tampón de lavado con centrifugaciones de 5 minutos a 2500 x g entre cada uno de ellos. Finalmente se retiró el sobrenadante del último centrifugado y se añadieron 40µL de SB 2X por muestra hirviendo durante 5 minutos a 95°C para ser congelado y posteriormente analizado mediante western blot.

3.7 Precipitación de proteínas mediante ácido tricloroacético (TCA)

El uso del ácido tricloroacético para la precipitación de proteínas tiene como fin la concentración y lavado de las mismas para aplicaciones posteriores. En este trabajo se realizaba este proceso con la intención de obtener un extracto crudo de las diferentes condiciones del ensayo a modo de control y previo al experimento, pudiendo comprobar y comparar la presencia de las proteínas de interés.

Tras la cuantificación de las muestras mediante el método de Bradford, se utilizaron 200µg de cada condición y llevándolos a un volumen total de 700µL. Posteriormente se adicionó 100µL de TCA 10%, se dejó incubar 30 minutos y se centrifugó a 13.500 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se utilizaron 200µL de acetona para realizar un lavado mediante vortex volviendo a centrifugar finalmente, repitiendo el proceso 2 veces más. En el último centrifugado se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 80µL de SB (Sample Buffer) 2X por muestra para resuspender el pellet, se hirvió a 95°C durante 4 minutos y se congeló para su posterior análisis mediante western blot.

3.8 Western Blot

Los extractos que se obtuvieron de los diferentes ensayos fueron analizados mediante western blot SDS-PAGE. En el montaje de la electroforesis se prepararon geles de acrilamida-bisacrilamida a una concentración del 10% y 1.5mm de grosor montados en un sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad). Tras cargar las muestras el voltaje utilizado fue de 120V durante 1h aproximadamente en *running buffer* (glicina 0.2M, Tris 25mM y SDS 0.1% [p/v]).

Una vez las muestras ya se han separado según su peso molecular, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilo, Immobilon Transfer Membranes, Millipore, 0.45µm) previamente activada mediante un baño en metanol durante 2 minutos. El paso de las proteínas del gel a la membrana tuvo lugar por electrotransferencia en un periodo de 90 minutos con un voltaje continuo de 100V en *transfer buffer* (glicina 0.1M, Tris12.5mM y metanol 20% [v/v]). Cuando transcurrieron los 90 minutos y con intención de comprobar el correcto funcionamiento de la transferencia se realizó una tinción con una solución de rojo Ponceau (Ponceau-S red 0.5% y ácido acético 1%), tiñendo las proteínas transferidas a la membrana y actuando simultáneamente de control de carga, debido a que la intensidad es proporcional a la cantidad de proteína.

Las membranas fueron lavadas y desteñidas con TBS-T (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, Tween-20 0.1% [v/v]) en agitación durante 10 minutos. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas, se procedió al bloqueo de las mismas con solución de bloqueo (TBS-T, 5% leche desnatada en polvo [p/v]) durante 1h. Tras esto, se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T BSA 5% y se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación constante. Posteriormente se retiraron los anticuerpos primarios y se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T en agitación y se pusieron los anticuerpos secundarios correspondientes disueltos en TBS-T 2% leche en polvo desnatada (p/v). Se dejó incubar 1h a temperatura ambiente y se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos en agitación con TBS-T, momento tras el cual se procedió a revelar las membranas.

Los anticuerpos secundarios utilizados para revelar las proteínas poseen unida a su estructura la peroxidasa de rábano capaz de reaccionar con el reactivo de revelado (ECL [Roche] o ECL-Plus [thermo Scientific]) permitiendo conocer la presencia o ausencia de las proteínas de interés. Para ello se utiliza el sistema de revelado de quimioluminiscencia Fuji LAS 4000, FujiFilm y se procesan las imágenes mediante el programa informático Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

3.9 Anticuerpos

En los ensayos de western blot los anticuerpos primarios utilizados quedan resumidos en la **Tabla 1**. Mientras que los anticuerpos secundarios utilizados fueron los anticuerpos anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano obtenidos en cabra.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la realización del proyecto

Anticuerpo Primario	Procedencia	Dilución	Anticuerpo secundario	Procedencia	Dilución
Anti- HspA1L	Prointech Ref. 13970-1-AP	1/1000	Anti-conejo (HRP)	Amersham GE Ref. NA931	1/5000
Anti-FLAG	Sigma Ref. F3165	1/1000	Anti-ratón (HRP)	Amersham GE Ref. NA934	1/5000
Anti-HA	Sigma Ref.H9658	1/5000	Anti-ratón (HRP)	Amersham GE Ref. NA934	1/5000
GFP	Inmunokontakt Ref. 210-PS-1GFP	1/5000	Anti-conejo (HRP)	Amersham GE Ref. NA931	1/5000
GAPDH	Santa Cruz Ref. SC-32233	1/1000	Anti-ratón (HRP)	Amersham GE Ref. NA934	1/5000
Tubulina	Sigma Ref. T6199	1/1000	Anti-ratón (HRP)	Amersham GE Ref. NA934	1/5000

4. Resultados

Los ensayos descritos en este trabajo tienen como objetivo la comprobación y validación de la existencia de una ubiquitinación diferencial de HspA1L por parte del complejo Laforina/Malina, así como su posible interacción directa. Para ello se plantearon los siguientes puntos:

4.1 Ubiquitinación de HspA1L por parte del complejo Laforina/Malina

El primer paso para validar a HspA1L como sustrato del complejo Laforina/Malina, fue la realización de un ensayo de ubiquitinación más específico con la intención de ver si efectivamente se producía una ubiquitinación diferencial. Para ello se diseñaron una serie de condiciones en las cuales a través de transfección de plásmidos se expresaron las proteínas de interés en la línea celular HEK293.

Tabla 3: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de HspA1L. Se muestran las 6 condiciones que se plantearon para el experimento.

	Condiciones
1	Ubiquitina pCMV + HA-HspA1L + HA-vacío
2	Ubiquitina pCMV + HA-HspA1L + Laforina + HA-vacío
3	Ubiquitina pCMV + HA-HspA1L + Malina WT + HA-vacío
4	Ubiquitina pCMV + HA-HspA1L + Laforina WT + Malina WT
5	Ubiquitina pCMV + HA-HspA1L + Laforina WT + Malina P69A
6	Ubiquitina pBsk + HA-HspA1L + Laforina WT + Malina WT

En la **Tabla 3** se muestran las 6 condiciones planteadas para este ensayo, el cual se decidió hacer en sobreexpresión de nuestra proteína de interés, a pesar de que la línea HEK293 también muestra expresión de HspA1L endógena. Las primeras 3 condiciones experimentales conformarían las condiciones control, mientras que la cuarta y quinta combinación de plásmidos representa la incógnita. Además, se decidió testar un segundo plásmido de transfección de ubiquitina, combinación 6, con el objetivo de conocer cuál de ellos proporcionaba una mejor ubiquitinación en los ensayos.

Transcurrido el tiempo establecido para la transfección, se recolectaron los lisados celulares de cada condición y se procedió con el ensayo de ubiquitinación TALON y a la obtención de los extractos crudos para su posterior análisis mediante western blot tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Observando los resultados y comparando las condiciones 4 y 5, se puede afirmar que HspA1L muestra una ubiquitinación diferencial debida al complejo Laforina/Malina, ya que cuando éste no es funcional debido a la presencia de la mutación P69A en Malina, la ubiquitinación se ve reducida significativamente como se aprecia en la primera membrana de la **Figura 8**. El resultado del ensayo es reafirmado por la ausencia de alteraciones en el patrón de ubiquitinación de Laforina en la condición 5 de la fracción unida en el segundo panel superior, y en los resultados de los extractos controles de transfección (todas las proteínas de interés estaban presentes a la realización del ensayo). Tampoco se observan alteraciones en las condiciones control (condición 1, 2 y 3) donde se expresa la ubiquitina junto con HspA1L y la ubiquitina con HspA1L y cada una de las proteínas del complejo Laforina/Malina separadamente.

En la condición 3 también se puede ver ubiquitinación de HspA1L de forma ligera, ya que HEK293 tiene expresión de Laforina endógena haciendo que HspA1L se vea ubiquitinada aunque no sobreexpresemos Laforina en esta condición.

Por otro lado, la sexta condición en la que se testaba la capacidad de ubiquitinación del plásmido de ubiquitina pBssk-6His-UBI en comparación con el plásmido pCMV-UBI/WT utilizado en el resto de las condiciones, resulta en una mayor eficiencia de ubiquitinación de HspA1L por el complejo Laforina/Malina, siendo este plásmido el utilizado de ahora en adelante en los próximos ensayos de ubiquitinación.

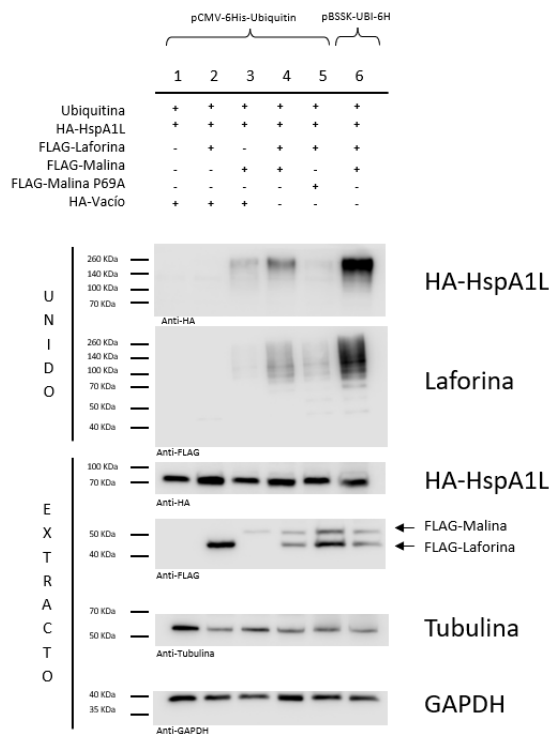


Figura 8: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación diferencial de HspA1L. La línea celular HEK293 fue transfectada con los plásmidos indicados y el análisis de ubiquitinación de HspA1L se realizó como se describe en Materiales y Métodos. El análisis se llevó a cabo con Malina silvestre y el mutante catalíticamente inactivo P69A. Las proteínas presentes en la fracción unida (Unido, proteínas retenidas en la cromatografía de afinidad de metal) o en el extracto crudo (Extracto) (50 µg) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos indicados.

Una vez analizado el resultado del ensayo de ubiquitinación, se quiso comprobar si esta modificación tenía lugar en la HspA1L endógena, es decir, sin sobreexpresión de la misma en nuestro modelo de estudio, ya que previamente se había comprobado que dicha proteína se expresaba en la línea celular utilizada, HEK293. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que en el ensayo anterior. Las células fueron transfectadas y 36 horas después de la transfección, se procedió a la realización del ensayo de ubiquitinación y a la obtención de los extractos crudos de las diferentes condiciones para su posterior análisis de los resultados mediante western blot. Las combinaciones de plásmidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de HspA1L endógena. Se muestran las 3 condiciones planteadas para la realización del ensayo.

	Condiciones
1	Ubiquitina BssK + HA-Vacío
2	Ubiquitina BssK + Laforina + Malina WT
3	Ubiquitina BssK + Laforina + Malina P69A

Como se puede ver en la **Figura 9**, el patrón de ubiquitinación obtenido tras el ensayo coincide con el del ensayo anterior. Se puede observar que HspA1L endógena se ubiquitina sólo cuando el complejo Laforina/Malina es funcional (comparar condiciones 2 y 3 del panel superior). El correspondiente control de ubiquitinación de Laforina sigue el mismo patrón. Y por último, se puede observar que todas las proteínas transfectadas se habían expresado.

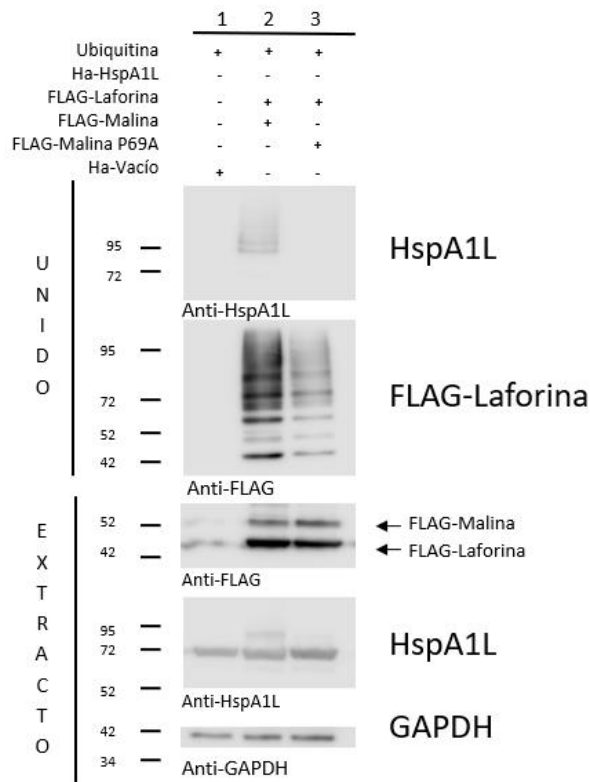


Figura 9: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L endógena. Se transfectó la línea celular HEK293 y el análisis de los resultados de ubiquitinación se realizó como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis se llevó a cabo con la utilización de Malina silvestre y Malina P69A catalíticamente inactiva P69A. Las proteínas presentes en el panel de la fracción unida son las proteínas que han sido retenidas en la cromatografía de afinidad de metal, mientras que las proteínas del extracto crudo son aquellas expresadas globalmente en cada condición (50 µg). Se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos indicados.

Una vez analizados y teniendo en cuenta ambos resultados, concluimos que HspA1L muestra un patrón de ubiquitinación diferencial cuando comparamos el nivel de ubiquitinación entre el complejo Laforina/Malina funcional con el catalíticamente inactivo Laforina/MalinaP69A, validando así los resultados obtenidos en el ensayo de ubiquitinación de alto rendimiento realizado previamente.

4.2 Topología de la ubiquitinación

El siguiente ensayo a realizar consistió en conocer la topología de las cadenas de poliubiquitinas introducidas por el complejo Laforina/Malina en HspA1L, ya que dependiendo de su conformación estructural, el significado fisiológico que representa puede variar. Si existe una poliubiquitinación en la lisina K48 de al menos 4 unidades, HspA1L será reconocida como una señal de degradación y será conducida al proteasoma. En cambio, si se produce la poliubiquitinación en la lisina K63, su funcionalidad es diferente y puede jugar un papel importante en la señalización inflamatoria.

Con la intención de conocer la topología de las cadenas de ubiquitina que se producen cuando HspA1L es ubiquitinada por el complejo Laforina/Malina, se diseñaron las condiciones que se muestran en la **Tabla 5**. En este caso se utilizó la ubiquitina procedente del plásmido pCMV, ya que las ubiquitinas utilizadas para este estudio también se expresan a partir de plásmidos de estructura similar. Utilizando el plásmido Ubiq-K48R se previene la formación de cadenas enlazadas en K48, mientras que usando el plásmido Ubiq-K63R se previene la poliubiquitinación mediante cadenas enlazadas en K63.

Tabla 5: Diseño experimental del ensayo de la topología de la ubiquitinación. Las ubiquitinas utilizadas en este ensayo tienen sendas mutaciones con el objetivo prevenir la poliubiquitinación en la lisina K48 o en la lisina K63.

	Condiciones
1	Ubiquitina CMV + HA-HspA1L + HA-Vacío
2	Ubiquitina CMV + HA-HspA1L + Laforina + Malina WT
3	Ubiquitina K63R + HA-HspA1L + Laforina + MalinaWT
4	Ubiquitina K48R + HA-HspA1L + Laforina + MalinaWT

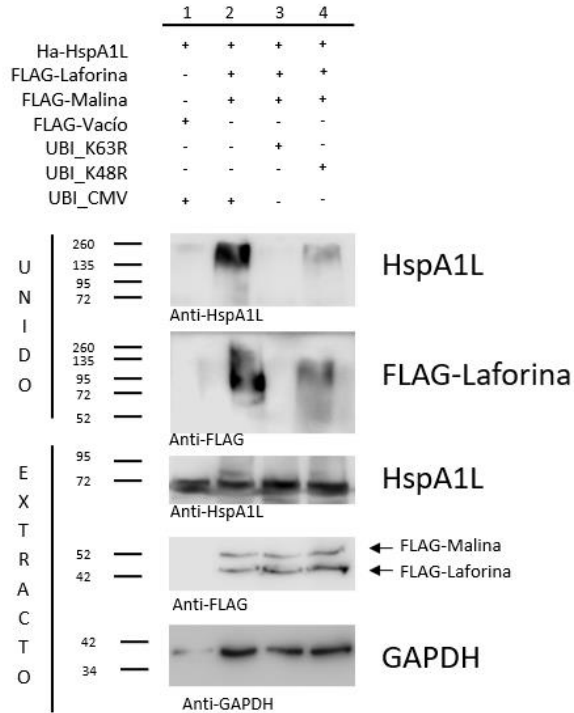


Figura 10: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L y el tipo de poliubiquitinación. Se transfeció el cultivo celular HEK293 y se procedió al análisis como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis se llevó a cabo con la utilización de ubiquitinas mutadas para la lisina 63 (K63R) y la lisina 48 (K48R). Las proteínas detectadas en el panel de la fracción unida son aquellas retenidas en la cromatografía de afinidad de metal, mientras que las proteínas del panel de extracto son las obtenidas de los extractos crudos de cada condición (50 µg). Se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos indicados.

En la **Figura 10** se muestra el resultado obtenido del ensayo de ubiquitinación. En este se puede observar cómo únicamente en presencia de ubiquitina silvestre (condición 2) o de la ubiquitina mutada en posición K48 (condición 4) se produce ubiquitinación de HspA1L. En cambio en las condiciones 1 (control) o condición 3 (ubiquitina mutada en K63), ésta no se produce. De esta forma se confirma que en ausencia de un residuo K63 funcional (UbiK63R) se previene la ubiquitinación de HspA1L, mientras que en ausencia de un residuo K48 funcional (UbiK48R), la ubiquitinación de HspA1L todavía puede darse.

Los resultados que se muestran se ven confirmados por la ausencia de ubiquitinación en K63 en Laforina (segundo panel superior), la expresión y niveles similares de proteínas presentes en el extracto (o controles de expresión en los extractos crudos, paneles inferiores).

4.3 HspA1L sólo necesita a Malina para su ubiquitinación

Dado que en los experimentos anteriores se ha validado la ubiquitinación diferencial HspA1L, el siguiente paso consistió en la comprobación de la necesidad de un complejo funcional o si la única presencia de Malina es suficiente para ubiquitinar HspA1L, dejando a Laforina con un papel regulador. Con este fin, se procedió a la realización de otro ensayo de ubiquitinación, pero en este caso el diseño experimental consta de dos grupos resumidos en la **Tabla 6**. Las células utilizadas son de la línea celular HEK293, que tiene expresión endógena de Laforina, y una línea celular que ha sido modificada mediante la herramienta molecular CRISPR para silenciar este gen, de forma que el complejo no se forma en el interior de la célula. En el primer grupo control, que consta de 3

condiciones, las células utilizadas sí que muestran expresión de Laforina. Por otro lado, el segundo grupo consta de las tres mismas condiciones pero la expresión de Laforina ha sido silenciada.

Tabla 6: Diseño experimental del ensayo de ubiquitinación de necesidad de laforina. El experimento se divide en dos grupos, uno control con expresión endógena de laforina y otro grupo en el cual se ha mutado el gen de laforina impidiendo su expresión. Además se muestran las condiciones utilizadas para cada grupo.

	Grupo Control		Grupo CRISPR
1	Ubiquitina BssK + FLAG-Vacío	4	Ubiquitina BssK + FLAG-Vacío
2	Ubiquitina BssK + Malina WT	5	Ubiquitina BssK + Malina WT
3	Ubiquitina BssK + Malina P69A	6	Ubiquitina BssK + Malina P69A

De igual forma que en los ensayos anteriores, se realizó una transfección de las células con la combinación de plásmidos indicada para cada condición, y se recogieron los lisados 36h después de la transfección para proceder al análisis de su ubiquitinación mediante western blot.

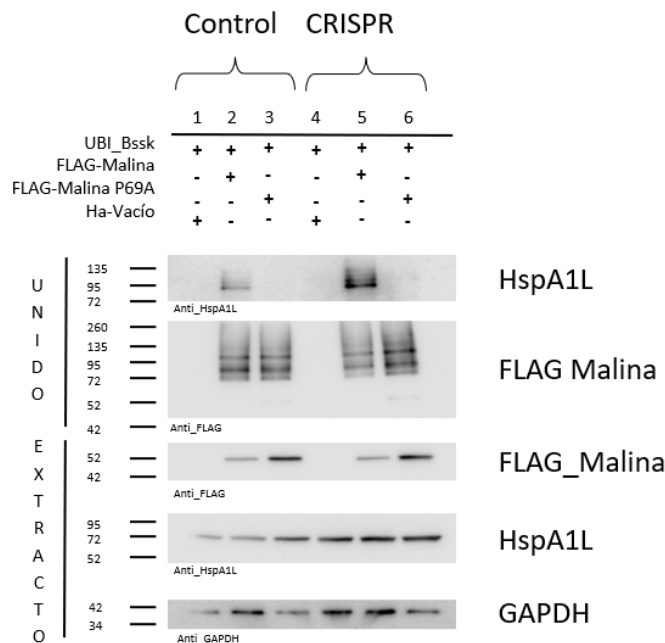


Figura 11: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de ubiquitinación de HspA1L y la necesidad del complejo para su ubiquitinación. Se transfectaron dos líneas celulares, la primera HEK293 y la segunda HEK293 R241X modificada mediante CRISPR. El análisis se llevó a cabo con la utilización de ambas líneas en la que HEK293 expresa Laforina, mientras que en la línea HEK293 R241X no existe expresión de la misma. En el primer panel se muestran las proteínas en la cromatografía de afinidad de metal, mientras que las proteínas del panel de extracto son aquellas obtenidas de los extractos crudos de cada condición (50 µg). Posteriormente se realizó un western blot utilizando los anticuerpos indicados.

Como se puede observar en los resultados, **Figura 11**, la ubiquitinación de HspA1L tiene lugar, cuando se expresa Malina WT, independientemente de la presencia de Laforina, por lo que la presencia de Laforina no sería necesaria para que la ubiquitinación de HspA1L tenga lugar. En condiciones patológicas (Malina P69A - condición 3 y 6), HspA1L sigue sin ser ubiquitinada.

Por otro lado, puede observarse una mayor cantidad de ubiquitinación cuando laforina no se encuentra presente en comparación con el grupo control. Este evento podría ser debido a diferencias en el control de carga, como indica el control de expresión de GAPDH.

4.4 HspA1L interacciona de forma directa con Malina y Laforina

Viendo todos los resultados obtenidos en los ensayos previos, se planteó comprobar la existencia de interacción directa entre HspA1L y las proteínas del complejo, Malina y Laforina. Con este objetivo se utilizaron plásmidos que expresaban las proteínas de interés fusionadas a GFP o CFP.

Se realizaron dos ensayos de interacción distintos, uno para comprobar la interacción de HspA1L con Malina y otro posterior con Laforina. En ambos casos, y tras las consecuentes transfecciones, se utilizó la resina GFP-TRAP_A (Chromotek, Alemania) como método de detección tal y como se explica en el apartado de Materiales y Métodos. También se quiso comprobar si la presencia del otro componente del complejo o de la condición patológica (Malina P69A) afectaba a la posible interacción entre las proteínas. Las condiciones y plásmidos planteados para la realización del experimento quedan resumidos en la **Tabla 7**.

Tabla 7 *Diseño experimental del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP. Para la realización de ambos ensayos se utiliza una marca distintiva de detección diferente, GFP para el ensayo de Malina y CFP para el de laforina. Se muestran además todas las combinaciones usadas para cada ensayo.*

	GFP-TRAP Malina	GFP-TRAP Laforina
1	GFP_Vacío + HA_HspA1L + FLAG_Vacío	CFP_Vacío + HA_HspA1L + FLAG_Vacío
2	GFP_Vacío + HA_HspA1L + FLAG_Laforina WT	CFP_Vacío + HA_HspA1L + FLAG_Malina WT
3	GFP_Malina + HA_HspA1L + FLAG_Vacío	CFP_Laforina + HA_HspA1L + FLAG_Vacío
4	GFP_Malina + HA_HspA1L + FLAG_Laforina WT	CFP_Laforina + HA_HspA1L + FLAG_Malina WT
5	GFP_Malina P69A + HA_HspA1L + FLAG_Vacío	CFP_Laforina + HA_HspA1L + FLAG_Malina P69A
6	GFP_Malina P69A + HA_HspA1L + FLAG_Laforina WT	

Los resultados del ensayo GFP-TRAP para Malina se pueden observar en la **Figura 12**, dónde las condiciones 3, 4, 5 y 6 muestran en la primera membrana la presencia de HspA1L confirmando de esta manera que se produce y existe una interacción directa entre la proteína de interés y Malina, independientemente de que sea Malina WT o Malina P69A.

La tercera membrana que se muestra en la imagen representa la interacción entre el propio complejo y actúa a modo de control interno (condiciones 4 y 6), ya que son en las que se encuentra simultáneamente Malina y Laforina. Solo cuando se expresa Malina WT esta es capaz de interactuar con Laforina (condición 4), en tanto que la forma Malina-P69A ha perdido esta capacidad de interacción (condición 6). Este resultado no es concluyente debido a que hay una menor presencia de Malina P69A en el extracto total obtenido causado por una posible menor eficiencia en la transfección.

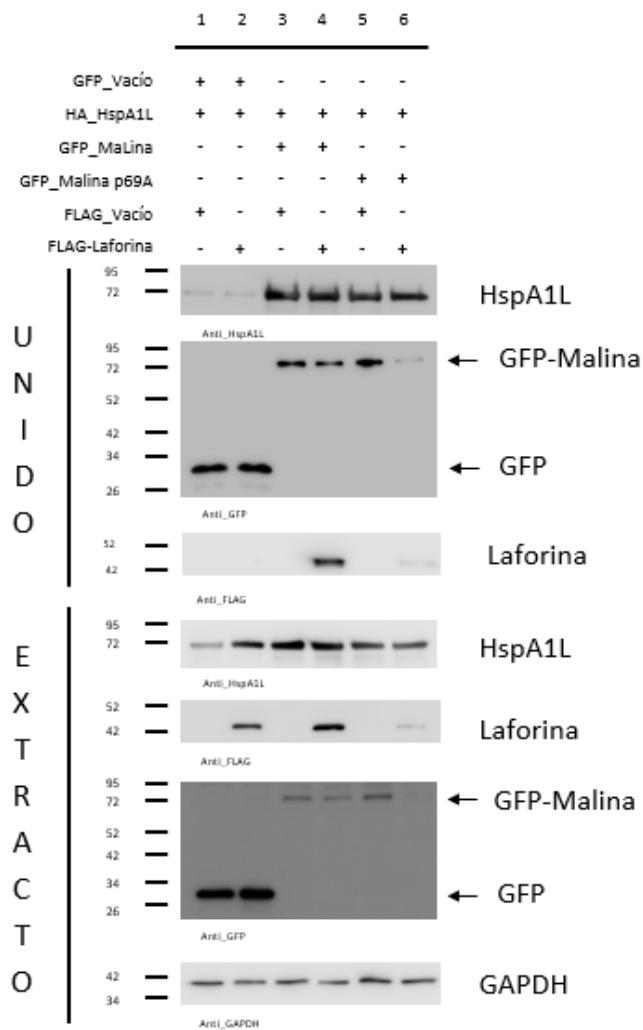


Figura 12: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP para Malina. Se transfectó la línea celular HEK293 y el análisis de la interacción se llevó a cabo mediante la utilización de la resina GFP-TRAP_A (Chromotek, Alemania) para Malina WT y MalinaP69A. En el primer panel se muestran las proteínas en la cromatografía de afinidad, mientras que las proteínas del panel de extracto son las obtenidas de los extractos crudos de cada condición (50 µg). Posteriormente se realizó un western blot utilizando los anticuerpos indicados.

Por lo que respecta al ensayo de inmunoafinidad para Laforina, los resultados se muestran en la **Figura 13**. En este diseño las condiciones a testar eran de la 3 a la 5, y en todas ellas se produce una interacción directa de HspA1L con Laforina, como se puede ver en la primera membrana de la Figura. Al igual que en el ensayo anterior, se utilizó de control interno la interacción entre Laforina y Malina. De la misma forma que en el ensayo previo, se observa una menor interacción entre Laforina y Malina P69A, aunque los resultados tampoco son concluyentes debido a una menor presencia o expresión de Malina P69A causado por una posible menor eficiencia en la transfección.

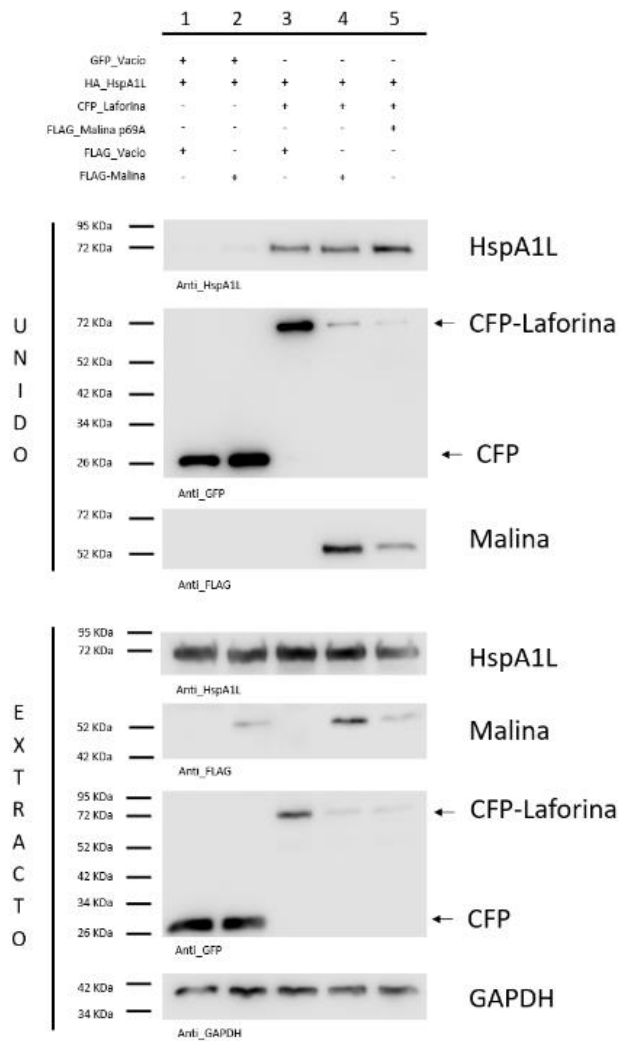


Figura 13: Análisis mediante western blot del resultado del ensayo de inmunoafinidad GFP-TRAP para Laforina. Se transfectó la línea celular HEK293 y el análisis de la interacción se llevó a cabo mediante la utilización de la resina GFP-TRAP_A (Chromotek, Alemania) para Laforina. El primer panel muestra las proteínas en la cromatografía de afinidad, mientras que las proteínas del panel de extracto son las proteínas de los extractos crudos de cada condición (50 µg). Posteriormente se realizó un western blot utilizando los anticuerpos indicados.

Una vez realizados los ensayos y teniendo en consideración ambos resultados, podemos afirmar que la chaperona de choque térmico, HspA1L, interacciona de forma directa con ambas proteínas del complejo, tanto con Malina como con Laforina. Esta interacción es independiente de la presencia del complejo, es decir, la interacción de HspA1L con Malina no está condicionada a la presencia de Laforina y viceversa. Además la interacción se produce también bajo aquellas condiciones patológicas en las que la Malina presenta la mutación P69A.

5. Discusión

Las enfermedades raras siempre han sido las grandes olvidadas por la investigación, pero sobre todo para la industria farmacéutica. A pesar de ello, durante la última década la sociedad está cada vez más concienciada sobre la presencia de este tipo de enfermedades, ya que su impacto individual, en cuanto a número de afectados, puede ser muy reducido, pero la suma de todos ellos representa una parte considerable de la sociedad. Por este motivo tanto la iniciativa de las familias como la inversión que se está haciendo en este ámbito, han impulsado el estudio de estas patologías. Programas europeos como la designación de fármacos huérfanos, la incentivación a las farmacéuticas o la estimulación a la investigación y desarrollo (*Comision de las comunidades europeas, 2008*), han permitido conocer de manera más profunda las causas, síntomas y posibles terapias de muchas enfermedades raras.

Precisamente ese es el motivo de este trabajo, conocer de forma más detallada los eventos que se dan lugar en la enfermedad de Lafora cuando se produce una mutación en uno de los componentes del complejo Laforina/Malina. En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las consecuencias más características que tiene la enfermedad como la acumulación de cuerpos de Lafora, neuroinflamación, desregulación de la proteostasis y la mitofagia (Lahuerta et al., 2018)(Desdentado et al., 2019)(Mitra et al., 2022).

Por el contrario queda por describir de forma mucho más detallada las alteraciones que se producen en las diferentes rutas que se ven desreguladas. A pesar de ello, hay estudios dónde se profundiza en las bases moleculares de la enfermedad. En algunos se plantea a los astrocitos como intermediario esencial en la aparición y desarrollo de la enfermedad, a pesar de que anteriormente se pensaba que los cuerpos de Lafora afectaban mayoritariamente a las neuronas (Rubio-Villena et al., 2018). Asimismo, también se ha demostrado la relevancia de la activación de genes relacionados con mediadores inflamatorios debido a la presencia de glía reactiva contribuyendo a la neuroinflamación (Lahuerta et al., 2020).

A día de hoy no existe un tratamiento curativo de la enfermedad de Lafora, tan sólo paliativos de algunas de las manifestaciones clínicas como la epilepsia mediante el uso de fármacos antiepilépticos, pero los pacientes acaban siendo refractarios a los mismos. Por lo que respecta a terapias experimentales, se han estudiado estrategias como el reemplazo genético (Mitra et al., 2022), o el uso de oligonucleótidos antisentido con el objetivo de silenciar la GS (Gumusgoz et al., 2021), pero se encuentran en fases preliminares o todavía tienen un largo recorrido hasta su llegada al paciente. Es por eso por lo que se necesitan buscar nuevos enfoques o intermediarios en la enfermedad para abordar nuevas posibles terapias. Recientemente se ha definido P-REX1 (PIP3-dependent Rac exchanger 1), como nuevo sustrato del complejo Laforina/Malina y que podría explicar la acumulación de poliglucosanos en la enfermedad, definiéndose como una posible nueva diana terapéutica (L Kumarasinghe et al., 2023).

A lo largo de este trabajo se ha valorado a HspA1L, proteína de choque térmico, como nuevo interlocutor en la enfermedad de Lafora, pudiendo constituir una nueva vía de actuación contra esta patología. Para ello, los objetivos marcados han consistido en la validación de una ubiquitinación diferencial en condiciones patológicas usando un modelo en la línea celular HEK293 y la comprobación de la existencia de interacción entre HspA1L y los componentes del complejo Laforina/Malina. Además se ha valorado también la necesidad de un complejo funcional completo y la topología de unión de las ubiquitininas a la proteína de interés.

Como se ha podido observar en el apartado de resultados de este trabajo, y gracias a los ensayos de ubiquitinación con la resina TALON y el ensayo de GFP-TRAP se han conseguido los objetivos marcados al principio de este trabajo.

Se ha podido constatar en la línea celular HEK 293, la existencia de una ubiquitinación diferencial de HspA1L por parte del complejo Laforina/Malina que está ausente en presencia de una Malina mutante, Malina P69A, que se corresponde con la mutación más prevalente entre los pacientes de la enfermedad conmutaciones en el gen *EPM2B*.

En la **Figura 8** se puede ver el resultado. Aunque en la condición 5 pueda verse un remanente de ubiquitinación en presencia de la Malina mutante, este nivel de ubiquitinación no sería suficiente como para recuperar el fenotipo sano de la enfermedad, no solo con respecto a HspA1L, sino a cualquier sustrato que pueda verse afectado por esta funcionalidad residual.

En este trabajo se ha demostrado por primera vez ubiquitinación de un sustrato del complejo Laforina/Malina a niveles endógenos de expresión como se puede observar en la **Figura 9**.

Otra de las características que se quiso conocer a cerca de la ubiquitinación de HspA1L por parte del complejo Laforina/Malina fue el tipo de ubiquitinación que este proporcionaba. Para ello se seleccionaron dos tipos de topología de poliubiquitinación K48 y K63. Aunque existen varias modificaciones en otras lisinas (K6, K11, K29 y K33), la poliubiquitinación en K48, concretamente entre el extremo C-terminal de una ubiquitina y la lisina 48 de la siguiente, constituye la señal de degradación de proteínas más común de la célula. Mientras que por otro lado, la poliubiquitinación en K63 está relacionada con la regulación de múltiples receptores del sistema inmunitario innato y adaptativo como el TNFr, el TCR o BCR, así como la activación y supresión de las células T y las B (Tracz & Bialek, 2021)(Madiraju et al., 2022). Además, recientemente se ha visto que el tipo de ubiquitinación producida tiene un papel relevante en enfermedades neurodegenerativas tan importantes como el Parkinson (Buneeva & Medvedev, 2022). Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la ubiquitinación en K63 es la forma más frecuente de ubiquitinación del complejo Laforina/Malina (Lorena Kumarasinghe et al., 2021).

Como se puede apreciar en la **Figura 10**, el tipo de modificación que tiene HspA1L tras ser ubiquitinada por el complejo Laforina/Malina es del tipo K63. Como se ha comentado anteriormente, la ubiquitinación en posición K63 se caracteriza por su función reguladora del sistema inmunitario tanto activadora, como supresora. Recientemente se ha descrito la importancia que tiene la ubiquitinación del tipo K63 en la activación de la ruta inflamatoria del inflamasoma, dónde los NLRs (NOD_like receptor) NOD1 y NOD2 oligomerizan al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), reclutando a RIPK2 (serina/treonina-proteína quinasa 2) que resulta ubiquitinada en posición K63 e impulsar la activación de NF- κ B y por tanto la formación del inflamasoma (Bednash & Mallampalli, 2016). Cuando HspA1L se encuentra en una situación patológica debido a que el complejo Laforina/Malina no es funcional, no puede ser ubiquitinada en posición K63 pudiendo impedir el correcto funcionamiento de la misma y por tanto contribuyendo al desajuste en la respuesta inflamatoria característica de la enfermedad.

La poliubiquitinación no solo puede producirse gracias a la unión homogénea de las lisinas, sino que pueden producirse combinaciones de ellas. Se han estudiado diferentes combinaciones entre las que se encuentra presente K63, entre ellas la poliubiquitinación del tipo K63/K48. Este tipo de cadenas heterogéneas actuaría regulando la señalización por NF- κ B. Por lo que resultaría interesante para próximos estudios, la realización de ensayos que permitan conocer de forma más específica la estructura de las cadenas de ubiquitina que presenta HspA1L.

En la literatura se describe al complejo Laforina/Malina como un complejo funcional que trabaja conjuntamente. Aunque laforina actúa como captador de sustratos, la que modifica las proteínas agregando la ubiquitina es malina, que es la que presenta la función de E3-ubiquitinligasa. Por este motivo nos planteamos la hipótesis de si la presencia de laforina era esencial para que HspA1L fuera ubiquitinada. Como se puede ver en la **Figura 11**, en el modelo CRISPR utilizado en el ensayo, Laforina no resulta necesaria para la ubiquitinación, condiciones 2 y 5, ya que se detecta ubiquitinación tanto en la condición control como en la condición a testar, en la que se utiliza una línea celular sin expresión de Laforina.

Valorando el resultado obtenido, HspA1L solo requiere a malina para ser ubiquitinada relegando a Laforina a una posición no esencial en su proceso de modificación. Por eso pensamos que Laforina solo tendría un papel secundario en el reclutamiento de HspA1L con la finalidad de mejorar o aumentar los niveles de ubiquitinación de HspA1L acercándola a Malina. Aunque se requieren más estudios para comprender el papel de Laforina en esta interacción.

Como último punto y objetivo del trabajo, se quiso comprobar la interacción directa de HspA1L con ambos miembros del complejo, Malina y Laforina. De esta forma podríamos afirmar el mecanismo por el cual se produce esa ubiquitinación diferencial que se ha visto previamente en los ensayos. Con este fin se utilizó el ensayo GFP-TRAP capaz de demostrar interacciones entre proteínas en las que una de ellas sea una proteína de fusión que contenga GFP.

En la **Figura 12** se muestra los resultados del ensayo para Malina, en el que de las 4 combinaciones posibles en las que HspA1L podía ser retenido por la resina, en todas ellas se produce. De esta forma podemos afirmar que HspA1L tiene una interacción directa con Malina, condición 3. En la condición 5, la malina que se utiliza es la Malina P69A característica de la enfermedad y aún así, se produce interacción entre ambas proteínas. Este hecho podría sugerir que la mutación P69A no es una mutación estructural que afecte a la capacidad de la proteína a interactuar con sus sustratos, sino que es una mutación de carácter funcional que no permite realizar la ubiquitinación aunque el sustrato se encuentre unido a Malina.

También hay que resaltar que la presencia de Laforina en las condiciones 4 y 6 no afecta de ninguna forma a la interacción entre Malina y HspA1L. Este evento podría reforzar el resultado obtenido en el ensayo anterior, en el que se discute la necesidad de Laforina para la ubiquitinación de HspA1L. Aunque se sigue requiriendo de estudios complementarios.

El resultado obtenido en el ensayo concuerda con la literatura existente donde se ha descrito la interacción entre Malina y Hsp70. Aunque HspA1L no tenga la misma secuencia y estructura que miembros de la familia a la que pertenece, sí que posee un 90% de identidad con los otros dos miembros, HspA1A y HspA1B, pudiendo reconocer de la misma manera a todos los miembros de las Hsp70 (Sengupta et al., 2011).

Por lo que respecta a Laforina, en la **Figura 13** se puede observar que, al igual que en el ensayo para Malina, de las tres condiciones en las que HspA1L puede interactuar con Laforina, el contacto se produce en todos ellos. Confirmando de esta manera que Laforina interactúa de forma directa con HspA1L, condición 3. También se realizó la prueba de interacción para Laforina en presencia de Malina y Malina P69A, obteniendo el mismo resultado que en el ensayo anterior. La presencia de ambas Malinas no interfiere en la interacción entre Laforina y HspA1L.

Este hecho también concuerda con los estudios previos en la literatura dónde se describe la existencia de interacción entre Laforina y Hsp70 (Garyali et al., 2009). De la misma forma que en la interacción con Malina, HspA1L, guarda una estrecha semejanza a los miembros de su familia, por lo que cabría esperar que pudiera interactuar con Laforina.

De este modo y teniendo en cuenta todos los resultados logrados, podemos afirmar la existencia de una ubiquitinación diferencial de HspA1L por Malina y que este suceso es debido a la interacción directa de HspA1L con los componentes del complejo Laforina/Malina, además de reportar que no es necesaria la presencia de laforina para la ubiquitinación y que ésta presenta una topología K63 con las consecuencias que eso conlleva. Gracias a estos hallazgos se abre la posibilidad de realizar nuevos ensayos con la finalidad de determinar el papel fisiológico que tiene HspA1L en la enfermedad de Lafora.

6. Conclusiones

Según los resultados obtenidos durante los diferentes ensayos, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) HspA1L se ubiquitina por Malina.
- 2) Malina introduce poliubiquitinas enlazadas por K63 en HspA1L.
- 3) En la ubiquitinación de HspA1L, no resulta necesaria la presencia de Laforina para que Malina ejerza su función.
- 4) HspA1L muestra interacción directa con el complejo, tanto con la E3-ubiquitinligasa, Malina, como con la fosfatasa de especificidad dual, Laforina.

7. Líneas futuras

El siguiente paso a estudiar son las consecuencias de la ubiquitinación de HspA1L por parte de Malina. En el presente estudio se ha utilizado la línea HEK293 derivada de células embrionarias de riñón humano. Ya que en la enfermedad de Lafora los astrocitos juegan un papel crucial en el desarrollo de la patología, sería conveniente el uso de un modelo celular basado en astrocitos, no solo para el estudio de la interacción entre HspA1L y el complejo Laforina/Malina en este tipo celular, sino para definir rutas que ayuden a comprender el papel de la ubiquitinación de HspA1L y las consecuencias de su ausencia en la enfermedad.

Por otro lado, sería interesante realizar nuevos ensayos de ubiquitinación con la finalidad de confirmar la topología que presenta la ubiquitinación de HspA1L, pudiendo dilucidar más concretamente el papel fisiológico que tiene ésta en la enfermedad de Lafora.

Finalmente, cabría resaltar la necesidad de la realización de estudios como ensayos de inmunofluorescencia o de localización subcelular en los que se investigue el papel de HspA1L en condiciones de choque térmico en la enfermedad, ya que esta proteína pertenece a la familia de las *Heat Shock proteins*. Sería conveniente también la realización de estos estudios sobre la intervención de HspA1L en condiciones de estrés oxidativo, ya que esta proteína se ha visto relacionada con este tipo de evento.

8. Bibliografía

- Austin, G. L., Simmons, Z. R., Klier, J. E., Rondon, A., Hodges, B. L., Shaffer, R., Aziz, N. M., Mcknight, T. R., Pauly, J. R., Armstrong, D., Kooi, C. W. Vander, & Gentry, M. S. (2020). *Central Nervous System Delivery and Biodistribution Analysis of an Antibody-Enzyme Fusion for the Treatment of Lafora Disease*. *16*(9), 3791–3801.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00396>.Central
- Bednash, J. S., & Mallampalli, R. K. (2016). Regulation of inflammasomes by ubiquitination. *Cellular & Molecular Immunology*, *13*(6), 722–728. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.15>
- Berthier, A., Payá, M., García-Cabrero, A. M., Ballester, M. I., Heredia, M., Serratosa, J. M., Sánchez, M. P., & Sanz, P. (2016). Pharmacological Interventions to Ameliorate Neuropathological Symptoms in a Mouse Model of Lafora Disease. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1296–1309.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9091-8>
- Brewer, M. K., Putaux, J.-L., Rondon, A., Uittenbogaard, A., Sullivan, M. A., & Gentry, M. S. (2020). Polyglucosan body structure in Lafora disease. *Carbohydrate Polymers*, *240*, 116260.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116260>
- Brewer, M. K., Uittenbogaard, A., Austin, G. L., Segvich, D. M., Roach, P. J., Mccarthy, J. J., Simmons, Z. R., Jason, A., Zhou, Z., Zeller, J., Young, L. E. A., Sun, R. C., James, R., Aziz, N. M., Hodges, B. L., Mcknight, T., Armstrong, D., & Gentry, M. S. (2020). *Targeting pathogenic Lafora bodies in Lafora disease using an antibody-enzyme fusion*. *30*(4), 689–705.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.002>.Targeting
- Buneeva, O., & Medvedev, A. (2022). Atypical Ubiquitination and Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073705>
- Burgos, D. F., Machío-Castello, M., Iglesias-Cabeza, N., Giráldez, B. G., González-Fernández, J., Sánchez-Martín, G., Sánchez, M. P., & Serratosa, J. M. (2022). Early Treatment with Metformin Improves Neurological Outcomes in Lafora Disease. *Neurotherapeutics*, *0123456789*.
<https://doi.org/10.1007/s13311-022-01304-w>
- Choi, S. I., Lee, J. H., Kim, R. K., Jung, U., Kahm, Y. J., Cho, E. W., & Kim, I. G. (2020). Hspa1l enhances cancer stem cell-like properties by activating igf1r β and regulating β -catenin transcription. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186957>
- Comision de las comunidades europeas. (2008). *COMUNICACIÓN DE LA COMISIÓN AL PARLAMENTO EUROPEO, AL CONSEJO, AL COMITÉ ECONÓMICO Y SOCIAL EUROPEO Y AL COMITÉ DE LAS REGIONES*. https://ec.europa.eu/health/ph_threats/non_com/docs/rare_com_es.pdf
- Cox, M. B., & Johnson, J. L. (2018). Evidence for Hsp90 Co-chaperones in Regulating Hsp90 Function and Promoting Client Protein Folding. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1709*, 397–422. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_28
- Dahiya, V., & Buchner, J. (2019). Functional principles and regulation of molecular chaperones. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *114*, 1–60.
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.001>
- Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R. A., Godfrey, V., Li, H.-H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D., & Patterson, C. (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5446–5458.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg529>

- Della Vecchia, S., Marchese, M., & Santorelli, F. M. (2022). Glial Contributions to Lafora Disease: A Systematic Review. *Biomedicines*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123103>
- Desdentado, L., Espert Tortajada, R., Sanz, P., & Tirapu-Ustárroz, J. (2019). Lafora disease: A review of the literature. *Revista de Neurología*, *68*(2), 66–74. <https://doi.org/10.33588/rn.6802.2018100>
- Dukhande, V. V., Rogers, D. M., Romá-Mateo, C., Donderis, J., Marina, A., Taylor, A. O., Sanz, P., & Gentry, M. S. (2011). Laforin, a dual specificity phosphatase involved in Lafora disease, is present mainly as monomeric form with full phosphatase activity. *PLoS ONE*, *6*(8), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024040>
- Duran, J., Hervera, A., Markussen, K. H., Varea, O., López-Soldado, I., Sun, R. C., Del Río, J. A., Gentry, M. S., & Guinovart, J. J. (2021). Astrocytic glycogen accumulation drives the pathophysiology of neurodegeneration in Lafora disease. *Brain*, *144*(8), 2349–2360. <https://doi.org/10.1093/brain/awab110>
- El Tahry, R., de Tourtchaninoff, M., Vrielynck, P., & Van Rijckevorsel, K. (2015). Lafora disease: psychiatric manifestations, cognitive decline, and visual hallucinations. In *Acta neurologica Belgica* (Vol. 115, Issue 3, pp. 471–474). <https://doi.org/10.1007/s13760-014-0399-3>
- Ganesh, S., Agarwala, K. L., Amano, K., Suzuki, T., Delgado-Escueta, A. V., & Yamakawa, K. (2001). Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *283*(5), 1046–1053. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4914>
- Garyali, P., Siwach, P., Singh, P. K., Puri, R., Mittal, S., Sengupta, S., Parihar, R., & Ganesh, S. (2009). The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system. *Human Molecular Genetics*, *18*(4), 688–700. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn398>
- Gentry, M. S., Downen, R. H., Worby, C. A., Mattoo, S., Ecker, J. R., & Dixon, J. E. (2007). The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *Journal of Cell Biology*, *178*(3), 477–488. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704094>
- Gentry, M. S., Guinovart, J. J., Minassian, B. A., Roach, P. J., & Serratosa, J. M. (2018). Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(19), 7117–7125. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803064>
- Gentry, M. S., & Pace, R. M. (2009). Conservation of the glucan phosphatase laforin is linked to rates of molecular evolution and the glucan metabolism of the organism. *BMC Evolutionary Biology*, *9*, 138. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-138>
- Gentry, M. S., Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2005). Insights into Lafora disease: Malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(24), 8501–8506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503285102>
- Gumusgoz, E., Guisso, D. R., Kasiri, S., Wu, J., Dear, M., Verhalen, B., Nitschke, S., Mitra, S., Nitschke, F., & Minassian, B. A. (2021). Targeting Gys1 with AAV-SaCas9 Decreases Pathogenic Polyglucosan Bodies and Neuroinflammation in Adult Polyglucosan Body and Lafora Disease Mouse Models. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, *18*(2), 1414–1425. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01040-7>
- Julie, T., Striano, P., Genton, P., Carpenter, S., A., C., Ackerley, & Minassian, B. A. (2016). Lafora Disease. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148.

<https://doi.org/10.1684/epd.2016.0842.Lafora>

- Kecmanović, M., Keckarević-Marković, M., Keckarević, D., Stevanović, G., Jović, N., & Romac, S. (2016). Genetics of lafora progressive myoclonic epilepsy: Current perspectives. *Application of Clinical Genetics*, 9, 49–53. <https://doi.org/10.2147/TACG.S57890>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kowalczyk, M., Kucia, K., Owczarek, A., Suchanek-Raif, R., Merk, W., Paul-Samojedny, M., & Kowalski, J. (2018). Association Studies of HSPA1A and HSPA1L Gene Polymorphisms With Schizophrenia. *Archives of Medical Research*, 49(5), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.10.002>
- Kumarasinghe, L., Garcia-Gimeno, M. A., Ramirez, J., Mayor, U., Zugaza, J. L., & Sanz, P. (2023). P-Rex1 is a novel substrate of the E3 ubiquitin ligase Malin associated with Lafora disease. *Neurobiology of Disease*, 177, 105998. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.105998>
- Kumarasinghe, Lorena, Xiong, L., Garcia-Gimeno, M. A., Lazzari, E., Sanz, P., & Meroni, G. (2021). TRIM32 and Malin in Neurological and Neuromuscular Rare Diseases. *Cells*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/cells10040820>
- Lahuerta, M., Aguado, C., Sánchez-Martín, P., Sanz, P., & Knecht, E. (2018). Degradation of altered mitochondria by autophagy is impaired in Lafora disease. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY>
- Lahuerta, M., Gonzalez, D., Aguado, C., Fathinajafabadi, A., Pallardó, F. V., & Sanz, P. (2020). Reactive glia-derived neuroinflammation, a novel hallmark in Lafora progressive myoclonus epilepsy that progresses with age. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1607–1621. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01842-z.Reactive>
- Li, J., Zhao, C., Li, Y., Wen, J., Wang, S., Wang, D., Dong, H., Wang, D., Zhao, Y., Wang, X., He, X., & Qin, J. (2022). Osteosarcoma exocytosis of soluble LGALS3BP mediates macrophages toward a tumoricidal phenotype. *Cancer Letters*, 528(December 2021), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.12.023>
- Madiraju, C., Novack, J. P., Reed, J. C., & Matsuzawa, S. ichi. (2022). K63 ubiquitination in immune signaling. *Trends in Immunology*, 43(2), 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.12.005>
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670–684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Mayer, Matthias P. (2010). Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell*, 39(3), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012>
- Mitra, S., Gumusgoz, E., & Minassian, B. A. (2022). Lafora disease: Current biology and therapeutic approaches. *Revue Neurologique*, 178(4), 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2021.06.006>
- Nakatsuka, A., Yamaguchi, S., Eguchi, J., Kakuta, S., Iwakura, Y., Sugiyama, H., & Wada, J. (2021). A Vaspin–HSPA1L complex protects proximal tubular cells from organelle stress in diabetic kidney disease. *Communications Biology*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01902-y>
- Nitschke, F., Ahonen, S. J., Nitschke, S., Mitra, S., & Minassian, B. A. (2018). Lafora disease — from pathogenesis to treatment strategies. *Nature Reviews Neurology*, 14(10), 606–617. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0057-0>

- Perez-Jimenez, E., Viana, R., Muñoz-Ballester, C., Vendrell-Tornero, C., Moll-Diaz, R., Garcia-Gimeno, M. A., & Sanz, P. (2021). Endocytosis of the glutamate transporter 1 is regulated by laforin and malin: Implications in Lafora disease. *Glia*, *69*(5), 1170–1183. <https://doi.org/10.1002/glia.23956>
- Puri, R., Suzuki, T., Yamakawa, K., & Ganesh, S. (2012). Dysfunctions in endosomal-lysosomal and autophagy pathways underlie neuropathology in a mouse model for Lafora disease. *Human Molecular Genetics*, *21*(1), 175–184. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr452>
- Rao, S. N. R., Maity, R., Sharma, J., Dey, P., Shankar, S. K., Satishchandra, P., & Jana, N. R. (2010). Sequestration of chaperones and proteasome into Lafora bodies and proteasomal dysfunction induced by Lafora disease-associated mutations of malin. *Human Molecular Genetics*, *19*(23), 4726–4734. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq407>
- Raththagala, M., Brewer, M. K., Parker, M. W., Sherwood, A. R., Wong, B. K., Hsu, S., Bridges, T. M., Paasch, B. C., Hellman, L. M., Husodo, S., Meekins, D. A., Taylor, A. O., Turner, B. D., Auger, K. D., Dukhande, V. V., Chakravarthy, S., Sanz, P., & Jr, V. V. W. (2015). *Structural Mechanism of Laforin Function in Glycogen Dephosphorylation and Lafora Disease*. *57*(2), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.020> Structural
- Romá-Mateo, C., Moreno, D., Vernia, S., Rubio, T., Bridges, T. M., Gentry, M. S., & Sanz, P. (2011). Lafora disease E3-ubiquitin ligase malin is related to TRIM32 at both the phylogenetic and functional level. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-225>
- Rubio-Villena, C., Viana, R., Bonet, J., Garcia-Gimeno, M. A., Casado, M., Heredia, M., & Sanz, P. (2018). Astrocytes: New players in progressive myoclonus epilepsy of Lafora type. *Human Molecular Genetics*, *27*(7), 1290–1300. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy044>
- Rubio, T., Viana, R., Moreno-Estellés, M., Campos-Rodríguez, Á., & Sanz, P. (2023). TNF and IL6/Jak2 signaling pathways are the main contributors of the glia-derived neuroinflammation present in Lafora disease, a fatal form of progressive myoclonus epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *176*, 105964. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105964>
- Sankhala, R. S., Koksai, A. C., Ho, L., Nitschke, F., Minassian, B. A., & Cingolani, G. (2015). Dimeric quaternary structure of human laforin. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 4552–4559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627406>
- Sanz, P., Serratos, J. M., & Sánchez, M. P. (2021). Beneficial effects of metformin on the central nervous system, with a focus on epilepsy and lafora disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms22105351>
- Sengupta, S., Badhwar, I., Upadhyay, M., Singh, S., & Ganesh, S. (2011). Malin and laforin are essential components of a protein complex that protects cells from thermal stress. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 13), 2277–2286. <https://doi.org/10.1242/jcs.082800>
- Serlidaki, D., van Waarde, M. A. W. H., Rohland, L., Wentink, A. S., Dekker, S. L., Kamphuis, M. J., Boertien, J. M., Brunsting, J. F., Nillegoda, N. B., Bukau, B., Mayer, M. P., Kampinga, H. H., & Bergink, S. (2020). Functional diversity between HSP70 paralogs caused by variable interactions with specific co-chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(21), 7301–7316. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012449>
- Singh, S., & Ganesh, S. (2009). Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Human Mutation*, *30*(5), 715–723. <https://doi.org/10.1002/humu.20954>

- Sinha, P., Verma, B., & Ganesh, S. (2021). Dexamethasone-induced activation of heat shock response ameliorates seizure susceptibility and neuroinflammation in mouse models of Lafora disease. *Experimental Neurology*, 340, 113656. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113656>
- Striano, P., Zara, F., Turnbull, J., Girard, J.-M., Ackerley, C. A., Cervasio, M., De Rosa, G., Del Basso-De Caro, M. L., Striano, S., & Minassian, B. A. (2008). Typical progression of myoclonic epilepsy of the Lafora type: a case report. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 4(2), 106–111. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0706>
- The Human Protein Atlas. (2020). *HspA1L transcriptomic data*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204390-HSPA1L/cell+line>
- Tracz, M., & Bialek, W. (2021). Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 26(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00245-6>
- Varea, O., Duran, J., Prats, N., Guinovart, J. J., & Biomedicine, M. (2022). *Suppression of glycogen synthesis as a treatment for Lafora disease: Establishing the window of opportunity*. 147, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105173>.Suppression
- Vemana, H. P., Saraswat, A., Bhutkar, S., Patel, K., & Dukhande, V. V. (2021). A novel gene therapy for neurodegenerative Lafora disease via EPM2A-loaded DLinDMA lipoplexes. *Nanomedicine*, 16(13), 1081–1095. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0477>
- Yoon, Y. M., Kim, H. J., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2019). Melatonin Enhances Mitophagy by Upregulating Expression of Heat Shock 70 kDa Protein 1L in Human Mesenchymal Stem Cells under Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184545>