

ETSIAMN – Universitat Politècnica de València

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado – 2016/2017

Análisis del perfil de interacción de diferentes mutantes patológicos en laforina mediante ensayos de doble híbrido en levadura

María Mariner Faulí

Tutora: **Dra. M^a Adelaida García Gimeno**

Cotutor externo: **Dr. Pascual Sanz Bigorra**

Valencia, julio de 2017

Análisis del perfil de interacción de diferentes mutantes patológicos en laforina mediante ensayos de doble híbrido en levadura

María Mariner Faulí

Tutora: Prof. Dña. M^a Adelaida García Gimeno

Cotutor externo: D. Pascual Sanz Bigorra

Valencia, julio de 2017

Abstract

Lafora disease (LD) is a neurodegenerative disorder, a type of rare progressive myoclonus epilepsy with autosomal recessive inheritance. The most distinctive feature of the disease is the presence of intracytoplasmic inclusions in different cell types (neurons, skeletal and cardiac muscle cells, liver cells and sweat gland cells). These granules are called Lafora Bodies (LB), in honour to their discoverer, the Spanish neurologist Gonzalo Rodriguez Lafora.

LB are made of insoluble polyglucosans composed of an aberrant form of glycogen. LD is due to mutations in two genes: on the one hand, *EPM2A*, which codes for a dual specificity phosphatase called laforin; and on the other hand, *EPM2B* gene, which codes for an E3 ubiquitin ligase called malin. Both proteins form a functional complex involved in glycogen synthesis regulation and also in other processes related to cellular proteostasis.

The major part of the described mutations causing the disease (70%) are present in laforin gene. However, these mutations present different penetrance depending on the type of alteration. In consequence, the deep functional characterization of the different mutations present in Lafora patients acquires great importance. This can make possible the identification of the most affected processes of cell physiology with each mutation and allows a deep insight into the functional characterization of each one, maybe establishing a prediction of the evolution of the pathomorphology of LD, with the aim of designing a personalized treatment.

In this project we have determined the interaction profile of a set of laforin mutations by using the yeast two hybrid technique. We have analysed the interaction of these mutants with known substrates such as malin or R5/PTG (a regulatory subunit of type I protein phosphatase involved in glycogen homeostasis). Moreover, we have also studied if these mutations also affect the dimerization of laforin, because it has been recently established that this protein forms homodimers and this could affect its biochemical properties. A general view of the results shows that all mutants behave quite similar when looking at the interaction with both substrates, either maintaining the interaction with respect to the wild laforin, losing it substantially or even duplicating it in the case of one of the mutants. With respect to homodimerization, there is more variability, and there are no mutants completely keeping the homodimerization capacity.

Key words: Lafora disease, laforin, yeast two hybrid, interaction.

Resumen

La enfermedad de Lafora (LD) es una enfermedad neurodegenerativa, un tipo de epilepsia mioclónica progresiva rara, de herencia autosómica recesiva. El rasgo más distintivo de la enfermedad es la aparición de inclusiones intracitoplasmáticas en diversos tipos celulares (neuronas, células del músculo esquelético y músculo cardíaco, células del hígado y células de las glándulas sudoríparas). Estos gránulos se denominan cuerpos de Lafora, (LB, por sus siglas en inglés) en referencia a su descubridor, el neurólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora.

Los LB están compuestos por poliglucosanos insolubles formados a partir de una forma de glucógeno aberrante. LD se debe a mutaciones en dos genes diferentes: por una parte el gen *EPM2A*, que codifica una fosfatasa dual denominada laforina; y por otra parte el gen *EPM2B*, que codifica una E3 ubiquitin ligasa denominada malina. Se ha demostrado que laforina y malina forman un complejo funcional que participa tanto en la regulación de la síntesis del glucógeno como en otros procesos relacionados con la proteostasis celular.

La mayor parte de las mutaciones descritas en la enfermedad (70%) se producen en el gen que codifica laforina, no obstante, estas mutaciones presentan distinta penetrancia en función del tipo de alteración. Por esto, es de gran interés la caracterización en profundidad de las distintas mutaciones que aparecen en pacientes de Lafora. Esto puede permitir la identificación de los procesos más afectados de la fisiología celular con dicha mutación y profundizar en la caracterización de la función de la misma, así como establecer una posible predicción en los pacientes de la evolución de la sintomatología de la enfermedad, con el fin de diseñar un tratamiento personalizado.

En este proyecto se ha determinado el perfil de interacción de una selección de mutaciones en la laforina descritas en pacientes mediante la técnica del doble híbrido en levaduras. Mediante dicha técnica ha sido analizada la interacción de dichos mutantes con sustratos conocidos como son la malina o R5/PTG (subunidad reguladora de la proteína fosfatasa de tipo 1 implicada en la homeostasis del glucógeno). Asimismo, se ha estudiado si estas mutaciones afectan a la dimerización de laforina, puesto que se sabe que laforina forma homodímeros y que esto puede afectar a las propiedades bioquímicas de la proteína. Una visión general de los resultados muestra que la mayor parte de los mutantes se comportan de un modo similar en su interacción con los dos sustratos estudiados, bien manteniendo la interacción, perdiéndola sustancialmente e incluso duplicándola en el caso de uno de los mutantes. En referencia a la homodimerización, existe más variabilidad, y no existen mutantes que mantengan por completo la capacidad de homodimerizar.

Palabras clave: enfermedad de Lafora, laforina, doble híbrido levaduras, interacción.

Resum

L'enfermetat de Lafora (LD) és una malaltia neurodegenerativa, un tipus d'epilèpsia mioclònica progressiva rara, d'herència autosòmica recessiva. El tret més distintiu de l'enfermetat es l'aparició d'inclusions citoplasmàtiques en diversos tipus cel·lulars (neurons, cèl·lules del múscul esquelètic i múscul cardíac, cèl·lules del fetge i cèl·lules de les glàndules sudorípares). Aquests grànuls s'anomenen cossos de Lafora (LB, per les seves sigles en anglès), en honor al seu descobridor, el neuròleg espanyol Gonzalo Rodriguez Lafora.

Els LB es componen de poliglucosans insolubles formats a partir d'una forma de glucogen aberrant. L'aparició dels LB es deu a mutacions en dos gens diferents: en primer lloc, el gen *EPM2A*, que codifica una fosfatasa d'especificitat dual anomenada laforina; y d'altra banda, el gen *EPM2B*, que codifica una E3 ubiquitina lligasa anomenada malina. S'ha demostrat que laforina i malina formen un complex funcional que participa tant en la regulació de la síntesi de glucogen com en altres processos relacionats amb la proteòstasi cel·lular.

La major part de les mutacions descrites a l'enfermetat (70%) es produeixen a laforina. No obstant, aquestes mutacions presenten diversa penetrància en funció del tipus d'alteració. Per això, és de gran interès la caracterització en profunditat de les diferents mutacions que apareixen en pacients de Lafora. Això pot permetre la identificació dels processos més afectats de la fisiologia cel·lular en cada mutació i profunditzar en la caracterització de la funció d'aquesta, així com establir una possible predicció de l'evolució de la simptomatologia de l'enfermetat als pacients, amb l'objectiu de dissenyar possibles tractaments personalitzats.

En aquest projecte s'ha determinat el perfil d'interacció d'una selecció de mutacions en laforina descrites en pacients mitjançant la tècnica del doble híbrid en llevat. Fent ús d'aquesta, s'ha analitzat la interacció d'aquests mutants amb substrats ja coneguts com son la malina o R5/PTG (subunitat reguladora de la proteïna fosfatasa de tipus 1 implicada en la homeòstasi del glucogen). També s'ha estudiat si aquestes mutacions afecten a la dimerització de la laforina, ja que es sap que laforina forma homodímers, i que açò pot afectar les propietats bioquímiques de la proteïna. Una visió general dels resultats mostra que la major part dels mutants es comporten de forma similar quan es tracta de la interacció amb els dos substrats estudiats, mantenint la interacció, perdent-la considerablement, inclús duplicant-la com es el cas d'un dels mutants. Pel que fa a l'homodimerització, existeix més variabilitat, i no trobem mutants que conserven per complet la capacitat d'homodimerització.

Paraules clau: enfermetat de Lafora, laforina, doble híbrid en llevat, interacció.

Agradecimientos

Resulta complicado recopilar en unas pocas palabras lo que ha significado la etapa que este trabajo culmina. Siempre se ha dicho que una buena síntesis ha de reflejar brevemente el hilo conductor del discurso, así que intentaré reflejar a todos los que han empezado o terminado unidos a ese hilo, a mí todavía corto -pero resistente- hilo rojo.

A mis padres, pues aquí el típico “gracias por aguantarme” cobra un significado de una magnitud más que considerable. Por enseñarme lo que es la constancia y el esfuerzo, destinando el suyo propio a que nunca me faltara formación. A mi madre por acompañarme a por renacuajos cuando yo también era una de ellos, por servirme de ejemplo, por su creatividad ilimitada, por ser brillante en cada nuevo reto que se marca y por esos documentales de *La2* que tanto bien me han hecho.

A Manel, por haberme ayudado con las mates en primero de primaria, y hasta la fecha. Por ser mi referente y mi modelo a seguir, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por su forma curiosa y atenta de ver el mundo, que me transmitió desde bien pequeña y que con mucho peso provocó la elección de esta carrera; por alimentar mis teorías de la conspiración cuando tengo la guardia baja y por venir desde las antípodas a pasar 15 días cada año para recuperar el tiempo perdido. Mi persona favorita.

A Ohana, habéis sido y seréis la gran suerte de la carrera. En especial a mis dos debilidades, Andrea y Rocío, gracias.

A mi tutora, Ada, por haber hablado de la rata topo desnuda el primer día de clase, increíble animal que solo unos pocos valoran, como increíble es ella. Me considero realmente afortunada por haber tenido a mi lado a una tutora que, con la calidad científica que posee, todavía tiene ganas de estar a pie de bancada enseñando a “Padawans” como yo, y soportando con risas los momentos en los que nos da por pipetear aire. No tengo palabras para agradecértelo todo, eres la alegría del laboratorio, una fuera de serie.

A mi cotutor, Pascual, por su atención cercana en todo momento, por sus correcciones prácticamente inmediatas, por su minuciosidad y su buen hacer y por amenizar los días con sus bromas –suelo creérmelas todas-.

A Carla, porque allá donde pisa huele a buena persona y por el buen rollo que transmite cada día. Y a Miguel, por que como bien dice Ada “es imposible no quererle”. Claro que me lo paso bien contigo, y claro que eres divertido, siempre, desde que las rosquilletas se llaman rosquilletas.

A Rosa, Ana, Belén, Pablo y al resto de compañeros del laboratorio de la Unidad de Señalización por Nutrientes, por hacerlo más fácil todos los días, por enseñarme siempre con buenas palabras y ayudarme con mis –no poco frecuentes- despistes. Sois un gran equipo, sois mis ganas de llegar al laboratorio. También a Lorena, por esa breve –pero intensa- incursión en el mundo de la elucidación estructural, por su disposición en todo momento, siempre precedida de una gran sonrisa.

Y como no, a mi compitrueno, mi amarillo, a Víctor. Por llegar en el momento justo y por conseguir que empezara a creer en mí de verdad. Por hacer de cada día una jornada de risa intensiva y por las conversaciones de horas filosofando sobre la vida. Qué bueno tenerte. T'estime i t'admire.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Enfermedad de Lafora	1
1.2 Laforina	2
1.3 Malina	5
1.4 Otros procesos alterados en la enfermedad de Lafora	8
1.5 Medicina personalizada	9
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	11
3.1.1 Bacterias	11
3.1.2 Levaduras	11
3.2 Plásmidos empleados	11
3.3 Enzimas de restricción empleadas	12
3.4 Subclonajes	12
3.5 Ensayo de doble-híbrido	12
3.5.1 Ensayo β -galactosidasa en filtro	13
3.5.2 Ensayo β -galactosidasa en medio líquido	14
3.6 Western Blot	14
3.6.1 Obtención de extractos de proteínas de las levaduras transformantes	14
3.6.2 Análisis por SDS-PAGE y electrotransferencia	14
3.6.3 Tinción Ponceau de la membrana de nitrocelulosa	15
3.6.4 Anticuerpos empleados	15
3.7 Análisis estadístico	15
4. Resultados	16
4.1 Mutantes estudiados	16
4.2 Estudios de interacción laforina-malina	16
4.3 Estudios de interacción laforina-R5/PTG	20
4.4 Comparativa de la interacción de laforina con los sustratos en estudio	23
4.5 Ensayos de homodimerización	24
4.5.1 Subclonación de los mutantes disponibles en el vector pGADT7	24
4.5.2 Estudio de la homodimerización de los mutantes testados	26
4.6 Heterodimerización	28
5. Discusión	28
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de los dominios presentes en la laforina humana y en SEX4 de <i>Arabidopsis</i> .	3
Figura 2. Modelo estructural de la estructura cuaternaria de la laforina unida a cadenas de maltohexaosa (verde) y a fosfatos (naranja).	4
Figura 3. Representación esquemática de los exones presentes en el gen <i>EPM2A</i> , de los dominios presentes en laforina y de la localización en la secuencia de todas mutaciones descritas hasta el momento en enfermos de Lafora.	5
Figura 4. Representación esquemática de los exones presentes en el gen <i>EPM2B</i> , de los dominios presentes en malina y de la localización en la secuencia de todas mutaciones descritas hasta el momento en enfermos de Lafora.	5
Figura 5. Diagrama esquemático del funcionamiento del proceso de ubiquitinación secuencial por las diferentes enzimas implicadas.	6
Figura 6. Diagrama esquemático diferenciativo del funcionamiento de las E3 ubiquitin ligasas HECT y RING.	6
Figura 7. Representación esquemática de los tres tipos diferentes de ubiquitinación.	7
Figura 8. Rutas moleculares alteradas en la enfermedad de Lafora.	8
Figura 9. Representación esquemática del funcionamiento del sistema de doble híbrido en levadura.	13
Figura 10. Estructura tridimensional de laforina humana.	16
Figura 11. Interacción por doble híbrido de los mutantes de laforina con malina.	17
Figura 12. Interacción de los mutantes de laforina con malina.	19
Figura 13. Interacción por doble híbrido de los mutantes de laforina con R5/PTG.	21
Figura 14. Interacción de los mutantes de laforina con R5/PTG.	22
Figura 15. Interacción de los mutantes de laforina con malina y R5/PTG.	23
Figura 16. Obtención de mutantes de laforina como fusión a GAD.	23
Figura 17. Obtención de mutantes de laforina como fusión a GAD.	25
Figura 18. Diagrama de los plásmidos empleados en el subclonaje de los mutantes disponibles en el vector receptor pGADT7 realizados con el software Vector NTI.	25
Figura 19. Ensayo de actividad β -galactosidasa en filtro (cualitativo) para estudiar la capacidad de homodimerización de algunos mutantes de laforina.	26
Figura 20. Interacción de los mutantes de laforina consigo mismos.	27
Figura 21. Interacción de laforina silvestre (WT) con los mutantes F88L y N163D.	28
Figura 22. Estructura tridimensional de la laforina que resume los resultados del proyecto	33

Abreviaturas

BSA: Albúmina de suero bovino

CAZy: Base de datos *Carbohydrate Active Enzyme database*

CBD: Dominio de unión a carbohidratos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSP: Dominio fosfatasa de especificidad dual

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

GAD: Dominio de Activación de Gal4

HA: Epítipo hemaglutinina

HECT: Homólogo al Carboxilo Terminal de E6

LD: Enfermedad de Lafora (por sus siglas en inglés: *Lafora Disease*)

OD: Densidad Óptica

ONPG: Orto-nitrofenil β -D-galactopiranosido

ORF: Pauta abierta de lectura

PBS: Tampón fosfato

PP1: Protein Phosphatase 1

PTG: Protein Targeting to Glycogen

PTPs: Protein Tirosina Fosfatasas

RE: Retículo Endoplasmático

RING: Really Interesting New Gene

SC: Medio Sintético Completo para levaduras

SD: Desviación Estándar

SDS-PAGE: Sodio dodecil sulfato-Electroforesis en gel de poliacrilamida

SEX4: Starch Excess 4

TBST: Tris buffer salino -Tween 20

UPS: Sistema Ubiquitin-Proteasoma

WT: Fenotipo silvestre (*Wild Type*)

YNB: Medio de cultivo para levaduras (*Yeast Nitrogen Base*).

YPD: Medio de cultivo para levaduras (*Yeast Peptone Dextrose*).

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Lafora

La enfermedad de Lafora [LD; OMIM 254780, ORPHA501] es una enfermedad neurodegenerativa fatal de herencia autosómica recesiva que entra en la clasificación de enfermedades raras, dada su baja prevalencia en la población, que es de 1/1.000.000. Es un desorden perteneciente al grupo de las epilepsias mioclónicas progresivas, en el cual se encuentran otras como la enfermedad de Unverricht-Lundborg, la ceroidolipofuscinosis, la sialidosis, la atrofia dentado-rubro-pálido-luisiana y la epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas. De las listadas, todas son enfermedades raras, y la mayoría son de herencia recesiva, aunque algunas pueden ser dominantes e incluso de herencia mitocondrial [1]. La enfermedad posee particular incidencia en países Mediterráneos, el norte y medio-este de África y en algunas regiones del sur de India, donde se dan altas tasas de consanguinidad [2].

En referencia a la sintomatología, el término mioclonía designa las contracciones musculares repentinas e involuntarias propias de las crisis de la enfermedad, que vienen acompañadas de ausencias y alucinaciones visuales. Posteriormente, aparecen los primeros síntomas de demencia y daño cerebelar. Además, también se manifiestan síntomas neuropsiquiátricos como depresión, apatía y cambios de comportamiento [2]. Se llega, en definitiva, tras un proceso de progresividad heterogénea entre pacientes, caracterizado por el agravamiento de las crisis epilépticas, a la muerte del afectado en un periodo de 5 a 10 años tras la aparición de los primeros síntomas. Normalmente, la enfermedad aparece durante la infancia tardía o inicios de la adolescencia, registrando su pico aproximadamente, entre los 14 y 17 años. Hasta este momento, el desarrollo mental y físico del paciente parece normal [1].

No fue hasta 1911 cuando el neurólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora, discípulo de Santiago Ramón y Cajal, describió la enfermedad, definiendo la presencia de lo que denominó “cuerpos amiláceos” acumulados en determinados tipos celulares de los pacientes analizados. Esta denominación se debió a que dichos cuerpos se teñían de forma similar al almidón. La realidad es que estas inclusiones están formadas por polisacáridos insolubles, y en referencia a su descubridor, los gránulos pasaron a denominarse “cuerpos de Lafora” [1].

Estas inclusiones intracitoplasmáticas no son más que acúmulos de poliglucosanos, integrados por un compuesto muy similar al glucógeno. De hecho, no se sabe con certeza si estas inclusiones son la causa o la consecuencia de la enfermedad. No obstante, el compuesto que las compone difiere del glucógeno en dos aspectos principales. En primer lugar, posee de 2 a 3 veces mayor cantidad de fosfato [3][4]. Y, a pesar de que ambos comparten los enlaces intermonoméricos, concretamente α -(1,4)-glicosídicos entre moléculas de glucosa y α -(1,6)-glicosídicos en las ramificaciones, resulta que el poliglucosano integrante de los cuerpos de Lafora está mucho menos ramificado que el glucógeno. Estas dos características lo hacen más similar a la amilopectina, componente mayoritario del almidón y homólogo vegetal del glucógeno, siendo por ello más insoluble en agua y, en consecuencia, más difícilmente movilizable [5]. Posteriores caracterizaciones de estos cuerpos de Lafora los han localizado en neuronas, células del músculo esquelético, del hígado, del

corazón y del conducto de las glándulas sudoríparas. Y aunque su distribución es muy amplia a lo largo del organismo, las neuronas son especialmente sensibles a la acumulación de poliglucosanos. Algunos autores postulan, que dicha acumulación provoca su apoptosis, al ser incapaces de resistir lo que se conoce como “toxicidad mediada por poliglucosanos”, lo que generaría una muerte neurológica incrementada en los afectados [6].

Hasta la fecha, existen dos hipótesis que pretenden explicar la cantidad excesiva de fosfato en los cuerpos de Lafora. Es cierto que para el almidón sí que se conocen enzimas encargadas de introducir y eliminar grupos fosfato, pero en el caso del glucógeno no se sabe qué enzima incorpora los grupos fosfato. La primera hipótesis plantea una incorporación errónea del fosfato en β de la UDP-glucosa por parte de la glucógeno sintasa en el poliglucosano [6], y la segunda postula que tal vez lo haga una glucógeno kinasa todavía no identificada [7].

La patología y el fenotipo propios de la enfermedad de Lafora vienen causados por mutaciones en dos genes: el *EPM2A*, siglas de *Epilepsy Progressive Myoclonus 2A* [8], [9] y el *EMP2B* [10].

Estudios de ligamiento y mapeos en homocigosis localizaron el gen *EPM2A* en el cromosoma 6q24, codificando una fosfatasa dual denominada laforina [11]. Las fosfatasas son enzimas de la familia de las esterasas cuya función es la eliminación de grupos fosfato de algunos sustratos, liberando una molécula de ión fosfato y dejando un grupo hidroxilo en el lugar en el que se encontraba dicho fosfato. Un 70% de los casos descritos de la enfermedad presentan mutaciones en este gen. Por otra parte, el gen *EPM2B*, se localiza en 6q22, y aparece mutado en un 20-30% de los pacientes, aunque la abundancia relativa de mutaciones en uno u otro gen es muy variable entre zonas geográficas. *EPM2B* codifica una E3 ubiquitina ligasa denominada malina [10], [12]. Un aspecto particular de la enfermedad es que los pacientes presentan síntomas y fenotipo muy similares, tengan la mutación en uno u otro gen. No obstante, sí que se ha descrito que aquellos que presentan algunas mutaciones en el gen *EPM2B* presentan una progresión más lenta de la enfermedad y tienen mayor esperanza de vida. Las proteínas codificadas por ambos genes, están involucradas en un complejo proceso, todavía no resuelto, implicado en la regulación de los niveles de glucógeno en la célula [8]. De hecho, la enfermedad de Lafora se ha clasificado recientemente como una enfermedad por acúmulo de glucógeno aberrante.

1.2 Laforina

La laforina es una proteína de 331 aminoácidos que viene codificada por el gen *EPM2A*, de 130 kilobases e integrado por cuatro exones. Su expresión es ubicua, aunque se expresa de forma más predominante en cerebro, músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado. Centrando la atención en el cerebro, laforina se expresa en cerebelo, hipocampo, córtex frontal y bulbo olfatorio [5]. La proteína presenta dos dominios: un dominio de unión a carbohidratos (CBD) situado en el extremo amino terminal, del aminoácido 1 al 124, seguido por un dominio fosfatasa de especificidad dual (DSP), del aminoácido 157 al 326, en el extremo carboxilo terminal (Figura 1) [13], [14]. La enfermedad está causada por mutaciones que afecten a cualquiera de los dos dominios [15]. La magnitud de la importancia biológica de la laforina se justifica por la presencia de ortólogos de laforina en todos los vertebrados así como en numerosos eucariotas unicelulares [5], [16].

El **dominio CBD** viene caracterizado según la CAZy (Carbohydrate Active Enzymes Database) [17], como perteneciente a la familia de dominios CBM20, muy

heterogénea en cuanto a estructura primaria, pero con residuos aromáticos bien conservados que regulan la unión al ligando. Gracias a este dominio, la laforina es capaz de unirse a glucógeno, amilopectina, y a los cuerpos de Lafora [5]

El **dominio DSP**, por otra parte, posee actividad catalítica, siendo el motivo CX5R (cisteína - 5 aminoácidos - arginina) el responsable de la misma, permitiéndole la hidrólisis de enlaces fosfoéster. Este dominio es miembro de la superfamilia de protein tirosina fosfatasas (PTPs) dependientes de cisteína, concretamente la C266 en el caso de la laforina, y constituye un núcleo catalítico muy conservado. La activación del dominio requiere un ambiente reductor, y se puede conseguir su inactivación reversible en condiciones oxidantes. Un rasgo característico de los dominios DSP es la forma de su sitio activo, menos profundo que el del resto de PTPs, hecho que permite la catálisis tanto sobre fosfotirosina como sobre fosfoserina y fosfotreonina [18].

Estos dos dominios confieren a la laforina uno de sus mayores rasgos distintivos, pues tras una búsqueda exhaustiva de posibles sustratos proteicos, se demostró que la laforina es, por el momento, la única fosfatasa, descrita en vertebrados, cuyo sustrato son poliglucosanos [16], [19], [20].

No obstante, se conocía con anterioridad que el almidón era fosforilado por dos enzimas diferentes en *Arabidopsis Thaliana*, concretamente, dos dikinasas [21]–[23]. Posteriormente, se identificó un gen en dicha planta con los mismos dominios que el *EPM2A*, pero en el orden contrario [24]. Además, mutaciones deletéreas en el gen producían acumulaciones de almidón, por lo que se denominó al gen como *SEX4* (Starch Excess 4).

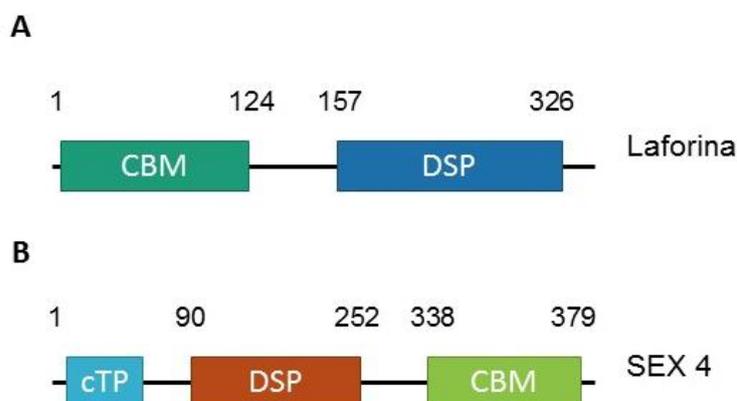


Figura 1. Representación esquemática de los dominios presentes en la laforina humana (A) y en SEX4 de *Arabidopsis* (B). Adaptado de [5].

La estructura tridimensional de la laforina ha sido elucidada recientemente unida a un fosfato y a maltohexaosa (Figura 2), oligosacárido soluble compuesto por seis fracciones de glucosa con un enlace glicosídico α -(1,4), que se emplea como modelo de las cadenas lineales del glucógeno. Esto ha permitido resolver que la laforina actúa en forma de homodímero antiparalelo, al que se unen cuatro moléculas de maltohexaosa, una por cada dominio, y dos de fosfato, una por dominio fosfatasa. Conformacionalmente, estos dímeros se disponen íntimamente asociados, generando una zona amplia de contacto, mediada por sus respectivos DSPs [25]. En base a esta

elucidación estructural, se considera que este homodímero corresponde a la forma fisiológicamente activa de la laforina, a pesar de que estudios *in vitro* han demostrado que la forma monomérica también tiene actividad fosfatasa [26].

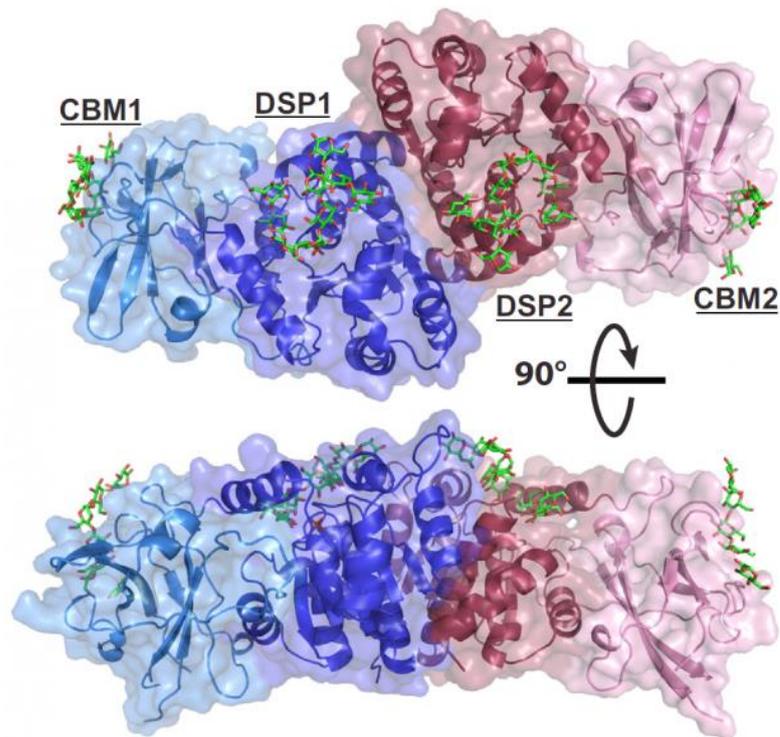


Figura 2. Modelo estructural que muestra la estructura cuaternaria de la laforina unida a cadenas de maltohexaosa (verde) y a fosfatos (naranja). Se ha elucidado su estructura como un dímero antiparalelo, integrado por dos moléculas de laforina, en azul y rojo, respectivamente. Cada molécula contiene un dominio CBD y DSP, integrando una estructura tetramodular del tipo: CBD1-DSP1-DSP2-CBD2. Las cadenas de maltohexaosa se unen a los dominios CBD y DSP con una única molécula de fosfato localizada en la base del sitio catalítico [25].

Por tanto, laforina actúa como proteína catalíticamente activa capaz de unirse y desfosforilar el glucógeno. La especificidad de esta actividad catalítica se demostró mediante mutagénesis dirigida, por introducción de una mutación en el aminoácido catalítico del dominio fosfatasa (C266S), resultando en la pérdida completa de la actividad catalítica, y demostrando que ésta es dependiente de la C266.

La elucidación de la estructura abre nuevos caminos para estudiar la función de la laforina en la desfosforilación del glucógeno y para entender cuál es el mecanismo por el que las diferentes mutaciones que se han descrito en la enfermedad de Lafora afectan en la actividad de esta enzima. Un número significativo de estas mutaciones están localizadas en regiones de la proteína que implican interacciones físicas, incluyendo el sitio activo DSP, el dominio CBM, la superficie que ambos conforman, regiones entre dominios individuales, y la interfaz del dímero DSP-DSP (Figura 3). En definitiva, mutaciones en ambos dominios dan lugar a una pérdida de función, demostrando que ambos son esenciales para que laforina lleve a cabo su actividad.

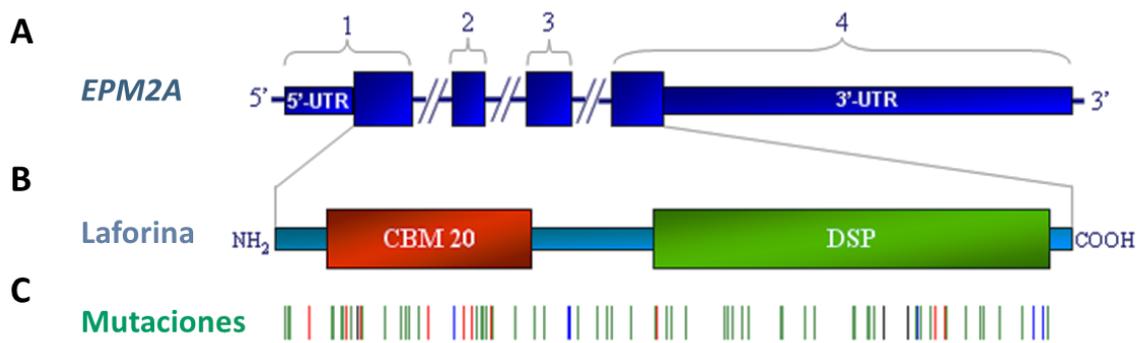


Figura 3. Representación esquemática de los exones presentes en el gen *EPM2A* (A), de los dominios presentes en laforina (B) y de la localización en la secuencia de todas mutaciones descritas hasta el momento en enfermos de Lafora (C). Imagen extraída y adaptada de la base de datos *The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database* (<http://projects.tcag.ca/lafora/>). Código de colores: rojo=delección; azul=inserción; verde=sustitución; negro=otras.

1.3 Malina

La segunda proteína que puede estar alterada en la enfermedad de Lafora es la malina, que está codificada por el gen *EPM2B*, compuesto únicamente por un exón. Como queda reflejado en la Figura 4, la malina posee un dominio E3-ubiquitin ligasa de tipo RING (Really Interesting New Gene) en su extremo amino terminal y seis dominios NHL, que median interacciones con otras proteínas y, según la modelización, se organizan en forma de propulsor β . Como ocurre con laforina, mutaciones en cualquiera de los dominios pueden causar la enfermedad [27], [28].

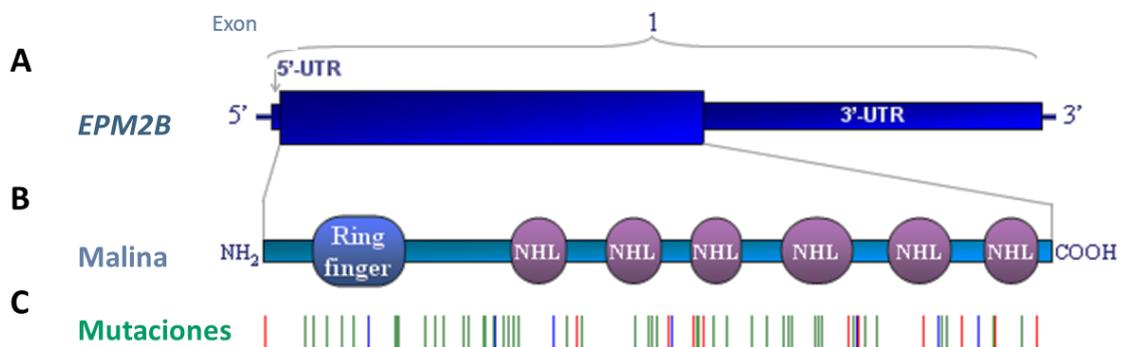


Figura 4. Representación esquemática de los exones presentes en el gen *EPM2B* (A), de los dominios presentes en malina (B) y de la localización en la secuencia de todas mutaciones descritas hasta el momento en enfermos de Lafora (C). Imagen extraída y adaptada de la base de datos *The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database* (<http://projects.tcag.ca/lafora/>). Código de colores: rojo=delección; azul=inserción; verde=sustitución; negro=otras.

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona covalente de las proteínas, en la que se une una o más moléculas de ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado en eucariotas, a un residuo de lisina de una cadena polipeptídica. La adición de ubiquitina es un proceso secuencial en el que participan tres enzimas (Figura 5). En primer lugar, la ubiquitina es activada por la unión a una enzima activadora de ubiquitina, E1. A continuación, se transfiere a una enzima conjugante de ubiquitina, E2. Finalmente, la ubiquitina se une a la proteína

diana por la acción de una tercera enzima, denominada ubiquitina ligasa o E3. Ésta última determina la especificidad de la ubiquitinación, es decir, a qué diana se transfiere la ubiquitina. Existen dos tipos de E3: las tipo HECT (Homologous to the E6 Carboxyl Terminus) y las tipo RING (Really Interesting New Gene). Las primeras poseen un residuo cisteína que sirve de intermediario entre la ubiquitina y la proteína diana, mientras que las E3 tipo RING como la malina carecen de actividad catalítica y simplemente actúan a modo de puente entre la E2 y la proteína sustrato final (Figura 6) [29].

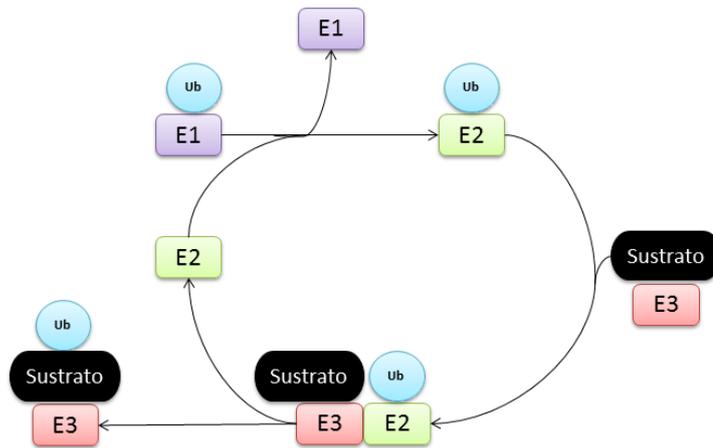


Figura 5. Diagrama esquemático del funcionamiento del proceso de ubiquitinación secuencial por las diferentes enzimas implicadas. Figura adaptada de [30].

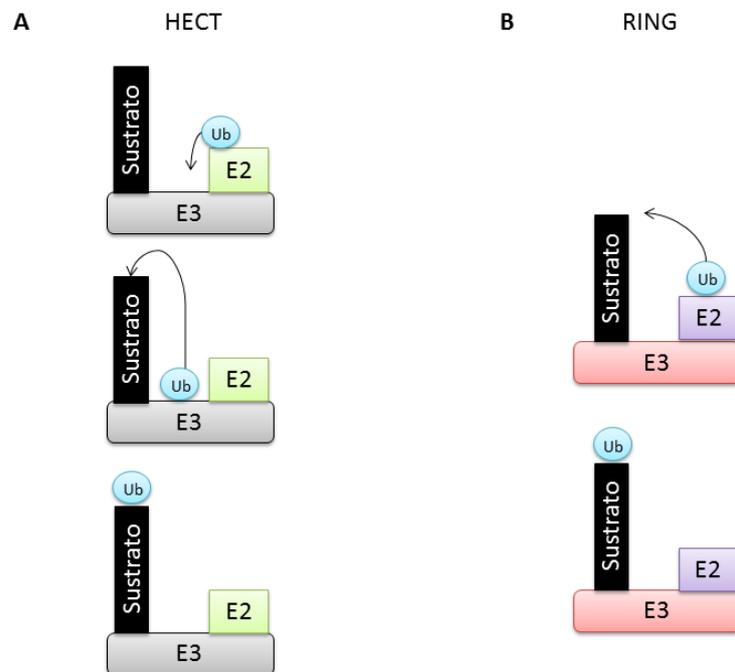


Figura 6. Diagrama esquemático diferenciativo del funcionamiento de las E3 ubiquitin ligasas HECT y RING. Figura adaptada de [31].

Existen tres tipos principales de ubiquitinación: monoubiquitinación, multiubiquitinación y poliubiquitinación (Figura 7). El primer tipo consiste en la adición de una única molécula de ubiquitina al sustrato. El segundo tipo consiste en la adición de moléculas de ubiquitina a varios residuos de lisina presentes en el sustrato. Y, el tercer tipo, se basa en la adición de una cadena de ubiquitinas a un residuo lisina presente en la proteína diana. Esto es posible gracias a la secuencia de la ubiquitina, que presenta siete residuos lisina sobre los que se puede generar dicha cadena. La presencia de un tipo u otro de ubiquitinación dirige la proteína modificada a diversos procesos fisiológicos, entre los que se encuentran la regulación de la expresión génica y el cambio en la actividad o localización del sustrato ubiquitinado.

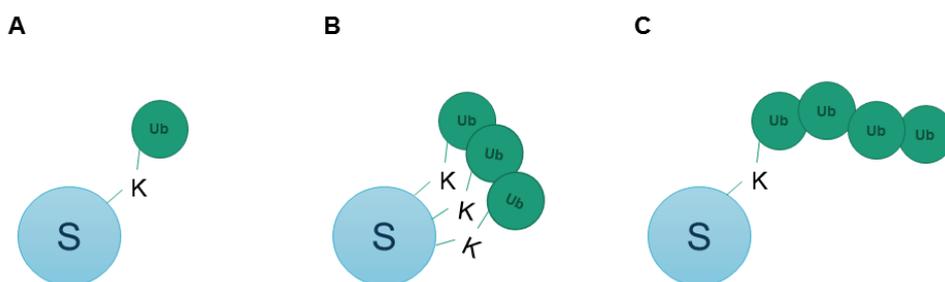


Figura 7. Representación esquemática de los tres tipos diferentes de ubiquitinación. (A) Monoubiquitinación. (B) Multiubiquitinación. (C) Poliubiquitinación.

Siendo malina una E3 ubiquitin ligasa, ésta posee diversos sustratos. Centrándonos en la enfermedad en estudio, la laforina es uno de ellos. Se ha demostrado *in vitro* que malina ubiquitina a laforina, marcándola para ser degradada en el proteasoma. Podría pensarse que si la malina perdiera su función, esto beneficiaría la actividad de laforina, provocando su acumulación y por tanto incrementando su capacidad de defosforilación para la posterior degradación de glucanos; pero esto no es así, pues como se sabe, mutaciones de pérdida de función en malina también traen como consecuencia la manifestación de la enfermedad de Lafora, con el mismo fenotipo histológico y neurológico que si el problema estuviera en laforina [32], [33].

Pero como ya se ha apuntado previamente, malina posee más sustratos. Entre ellos destacan diversas enzimas implicadas en el proceso de síntesis y degradación de glucógeno como la glucógeno sintasa, las subunidades R5/PTG (homóloga de la *Protein Targeting to Glycogen* murina) y R6 de la PP1 (Protein Phosphatase 1) y la enzima desramificadora del glucógeno [16], [34], [35]. Con los datos actuales, se plantea que laforina actúe como intermediaria entre malina y estas proteínas, de modo que mutaciones en cualquiera de las dos provoquen que el proceso de síntesis de glucógeno se lleve a cabo sin ningún tipo de regulación y por ello se genere la acumulación de los característicos cuerpos de Lafora.

Focalizando la atención en la subunidad R5/PTG, cabe destacar que su interacción con laforina ha sido demostrada mediante experimentos de colocalización y arrastre [36]. R5/PTG se une a PP1 y, en esta condición, desfosforila a la glucógeno sintasa, activándola. Además, también desfosforila a la glucógeno fosforilasa, pero en este caso la inactiva. La combinación de estos dos procesos trae consigo el aumento

en los niveles de glucógeno celular. Ahora bien, el papel de la laforina aquí radica en que, al unirse a la subunidad R5/PTG, la conduce hasta malina, que la ubiquitina para su degradación. En consecuencia, disminuyen los niveles de glucógeno celular. La explicación de este proceso refuerza la comprensión del rol de la laforina como componente crucial de un complejo multiproteico asociado al glucógeno, confirmando de nuevo que laforina está muy involucrada en el proceso de regulación del metabolismo del glucógeno.

Por tanto, el rol que laforina y malina juegan en la regulación de la homeostasis del glucógeno puede entenderse por dos caminos. En primer lugar, la laforina actúa como fosfatasa de carbohidratos complejos, siendo esta función necesaria para mantener esta homeostasis. En ausencia de laforina, el glucógeno quedaría altamente fosforilado y sería insoluble. Y en segundo lugar, laforina actuaría interactuando físicamente con malina formando un complejo funcional en el que laforina recluta diversas enzimas de función fundamental en la regulación de la homeostasis del glucógeno para que malina las ubiquitine y sean degradadas (Figura 8 A) [32].

1.4 Otros procesos alterados en la enfermedad de Lafora

En la enfermedad de Lafora, no solo la homeostasis del glucógeno se ve alterada. Otros procesos celulares también se ven mermados (Figura 8).

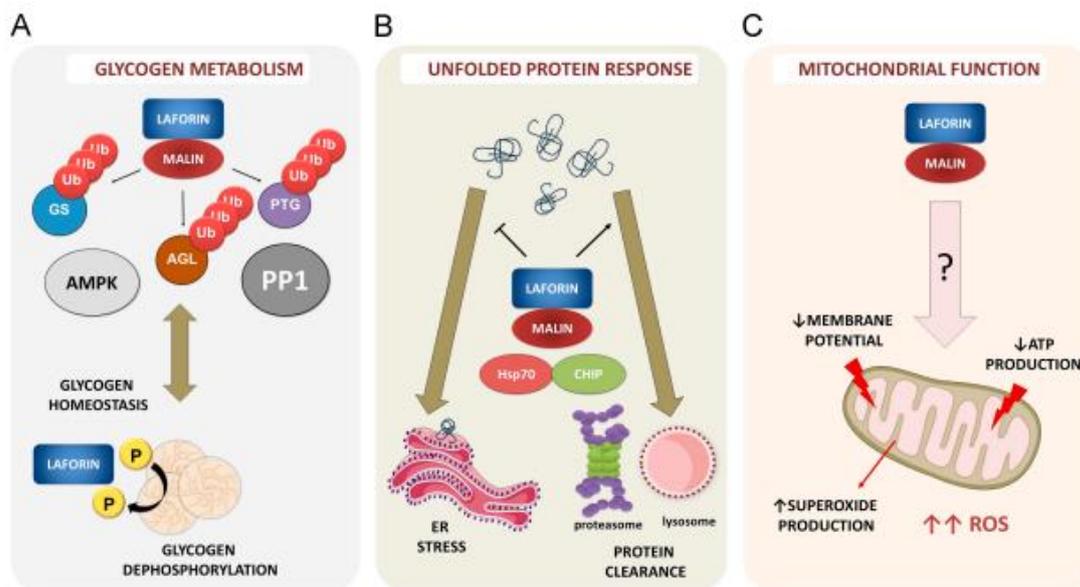


Figura 8. Rutas moleculares alteradas en la enfermedad de Lafora. **(A)** Metabolismo del glucógeno, **(B)** respuesta a proteínas mal plegadas y, **(C)** función mitocondrial, recientemente propuesta [32].

En primer lugar, se han descrito alteraciones en el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) en modelos celulares de la enfermedad. Se propone que en estas células, las condiciones de estrés perjudiquen las actividades de la maquinaria de chaperonas y el UPS, provocando la acumulación de estas proteínas alteradas en los cuerpos de Lafora, siendo especialmente perjudiciales en células particularmente sensibles, como las neuronas, por lo que pueden participar en la fisiopatología de la enfermedad [32]. Esto guardaría relación con el segundo proceso alterado en la enfermedad. Sabiendo que existe una disfunción en el UPS, esto podría provocar también la alteración de los lisosomas y problemas en la autofagia. Actualmente, la

discusión radica en si el defecto en la autofagia es causa o consecuencia de la acumulación de cuerpos de Lafora, cuestión que todavía debe ser estudiada [32].

Además, también se ha demostrado que el complejo funcional laforina-malina juega un papel clave en proteger al retículo endoplasmático (RE) del estrés por proteínas mal plegadas [37]. Al eliminar laforina o malina en modelos celulares se aprecia un incremento en la respuesta a estrés en el RE en las células, que pueden estar colaborando en el desarrollo de la fisiopatología de la enfermedad de Lafora [37], [38]. Por último, cabe destacar que también se han descrito alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias de pacientes de Lafora, lo que explicaría el acúmulo de especies reactivas del oxígeno en los fibroblastos de pacientes [32].

1.5 Medicina personalizada

Dada la gran variedad de mutaciones descritas en LD, la enfermedad posee una especial complejidad en cuanto a que, a pesar de que la sintomatología es similar para todas ellas, la base de la alteración podría tener una naturaleza diferente dentro del proceso global de regulación de homeostasis del glucógeno.

Si fuera posible relacionar las mutaciones que dan lugar a la enfermedad de Lafora con un cuadro sintomatológico específico se podría predecir el curso de la enfermedad con mayor exactitud. Es por ello que, una vez se caracterice a fondo el proceso patológico de la LD, será necesario el diseño de tratamientos y fármacos enfocados a paliar o resolver la ruta patológica específica que podría estar desencadenando cada tipo de mutación.

Por tanto, este proyecto está enfocado a ser una primera incursión en lo que será la medicina personalizada en la enfermedad de Lafora. Conociendo la alteración genética, su repercusión en la estructura y funcionalidad de la proteína resultante y disponiendo de datos sobre el entorno y las particularidades del paciente, se buscará optimizar al máximo el tipo de tratamiento que se propone para cada paciente. Para ello es muy importante la caracterización funcional y estructural de cada mutación, lo que a día de hoy representa un reto, pues todavía no han sido elucidadas con exactitud las funciones exactas de laforina, malina y el resto de subunidades reguladoras del glucógeno implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de este último. Además, los intentos de cristalización de la interacción de laforina con malina o con R5/PTG han resultado fallidos, con lo cual es difícil prever cómo afectará cada mutación a las interacciones que laforina lleva a cabo en las diversas funciones que desempeña.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es determinar el perfil de interacción de una selección de mutaciones en la laforina descritas en pacientes utilizando la técnica del doble híbrido en levaduras. Por medio de estos ensayos se estudiará:

1. La interacción de los mutantes con sustratos conocidos de laforina, como son malina, con la que forma un complejo funcional, y R5/PTG, subunidad reguladora de la proteína fosfatasa de tipo 1 implicada en la homeostasis del glucógeno, con quien interacciona para presentársela a malina y promover su ubiquitinación.
2. Los efectos de las mutaciones sobre la capacidad de dimerización de laforina.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

3.1.1 Bacterias

La cepa bacteriana empleada en este trabajo ha sido la DH5 α de *Escherichia coli* (Stratagene). Se utilizó para la clonación y amplificación de los plásmidos de expresión de proteínas.

Las cepas se cultivaron a 37°C en agitación en medio de cultivo LB (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, y NaCl 1 % a pH=7.5), suplementando cuando se precisaba con ampicilina (100 μ g/mL).

Las transformaciones se realizaron en bacterias electrocompetentes. Éstas se transformaron por electroporación a 1700 V. Posteriormente, se recuperaron por crecimiento en LB durante 1h a 37 °C, y se sembraron en placas de medio LB con ampicilina, para conseguir la selección de aquellas que habían incorporado el plásmido, dotado del gen de resistencia a dicho antibiótico.

3.1.2 Levaduras

En los ensayos de doble híbrido se empleó la cepa de *Sacharomyces cerevisiae* THY-AP4 [*MAT α ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] [39].

Los cultivos de levadura se crecieron en medio rico YPD [peptona bacteriológica 2% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v) y glucosa 2% (p/v) a pH 6] o en medio sintético completo SC [YNB, *Yeast Nitrogen Base* (Difco™) al 0.67%, 2% (p/v) glucosa y una mezcla de aminoácidos al 0.095%] suplementado con los requerimientos necesarios para la selección del plásmido. La temperatura de crecimiento fue de 30 °C, manteniendo la agitación.

Las levaduras fueron transformadas por el método de acetato de litio [40]. Para ello, se crecieron en YPD 2% glucosa hasta que alcanzaron una densidad óptica (OD) a 600 nm de entre 0.4 - 0.8, que se corresponde con la fase de crecimiento exponencial, y se recogieron por centrifugación a 4000 r.p.m durante 5 min. Tras dos lavados con tampón TE-LiAc (acetato de litio 0.1 M pH 7.5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), se resuspendieron en un volumen 1/100 del cultivo inicial con el mismo tampón TE-LiAc indicado antes. A 50 μ L de esta suspensión celular se le añadieron 2 μ L de DNA de esperma de salmón 100 mg/mL desnaturalizado (Sigma), 3-5 μ L de cada uno de los plásmidos y 300 μ L de PEG-TE-LiAc (TE-LiAc con PEG al 40 %). Tras incubar las células a 30 °C durante 30 min, fueron sometidas a un choque térmico de 5 min a 42°C en presencia de DMSO al 10%. Tras dos lavados con agua estéril para eliminar los restos de DMSO y PEG, se sembraron las células en placas de SC (sólido, agar al 2% (p/v)) sin incluir aquellos requerimientos necesarios para la selección de los plásmidos. Las células se incubaron a 30 °C durante al menos dos días, hasta la aparición de colonias individuales.

3.2 Plásmidos empleados

Las proteínas de fusión con el dominio de unión al DNA LexA se realizaron empleando el vector pEG202, cuyo marcador es *HIS3* [41], por tanto, sin aporte

externo de histidina al medio, las células no transformadas no pueden crecer, pues son auxótrofas para este aminoácido.

Las proteínas de fusión con el dominio activador GAD (GAL4 Activation Domain) se realizaron empleando el vector pGADT7 (Clontech) o pACTII (Legrain et. al 1994), que lleva como marcador *LEU2* y, además, una etiqueta con HA (hemaglutinina) que permite comprobar los niveles de expresión empleando anticuerpos anti-HA mediante western blot.

Los distintos plásmidos utilizados en los ensayos de doble híbrido descritos en este trabajo se utilizaron para la transformación de levaduras. Estos plásmidos se amplificaron en *E.coli* y se purificaron de los respectivos cultivos empleando el kit de minipreps de la marca comercial GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3 Enzimas de restricción empleadas

Las enzimas de restricción empleadas en este proyecto han sido *BamHI*, *XhoI*, *Sall* y *SmaI* de ThermoFisher Scientific. Para desfosforilar los vectores se utilizó fosfatasa alcalina de la casa comercial Roche.

3.4 Subclonajes

Para la preparación de los vectores e insertos, los fragmentos de DNA digeridos con el correspondiente enzima de restricción fueron purificados empleando el kit de purificación de GE Healthcare siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar que los vectores digeridos religaran, éstos se trataron con fosfatasa alcalina. Para la construcción de los plásmidos se empleó *Quick Ligase* de New England Biolabs y se dejó reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente, purificando a continuación la mezcla de ligación con el kit Gene Clean de MP Blomedicals, y empleando posteriormente *E.coli* DH5 α como cepa hospedadora. Se creció en medio LB [LB, peptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,5] y para la selección de plásmidos se utilizó ampicilina (100 μ g/mL). La temperatura de crecimiento fue de 37°C. Los cultivos se crecieron en medio líquido con agitación continua en un agitador orbital a 200 r.p.m.

3.5 Ensayo de doble-híbrido

La técnica de doble híbrido fue diseñada por Stanley Fields [42] como una herramienta para identificar interacción *in vivo* de proteínas. Está fundamentada en la separación de los dominios de los factores de transcripción: un dominio de unión a secuencias específicas de ADN y un dominio activador de la transcripción de un gen reportero. Si existe interacción entre proteínas, ambos dominios entrarán en contacto y el gen reportero será transcrito.

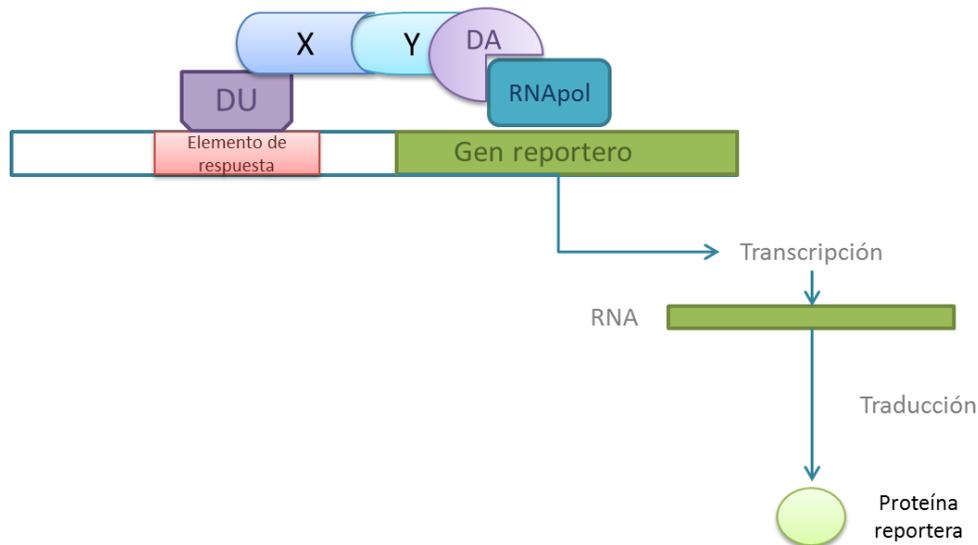


Figura 9. Representación esquemática del funcionamiento del sistema de doble híbrido en levadura. Donde DU es Dominio de Unión, DA es el Dominio de Activación, y X e Y son las proteínas cuya interacción se estudia fusionadas a los correspondientes dominios.

En el presente trabajo, la cepa THY-AP4 [*MAT α ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] [39] fue co-transformada con diferentes parejas de plásmidos. Uno de ellos fusionado al dominio de activación de la transcripción (GAD) y otro plásmido con el dominio de unión a ADN (LexA). La asociación física entre las dos proteínas fusión permite la transcripción del gen *lacZ*, que codifica una enzima cuya actividad es cuantificable (β -galactosidasa).

La cepa de *Sacharomyces cerevisiae* THY-AP4 fue co-transformada con diversas combinaciones de parejas de plásmidos. Un componente de cada pareja llevaría laforina silvestre o mutada fusionada con el dominio de unión al DNA LexA, y el segundo componente llevaría la proteína cuya interacción quería estudiarse fusionada al dominio de activación de la transcripción GAD (Gal4 Activation Domain), que podría ser la misma laforina, laforina mutada, malina o la subunidad R5/PTG.

Los transformantes se crecieron en condiciones selectivas [SC, 2% (p/v) glucosa] y en ausencia de los aminoácidos esenciales Leu e His, marcadores de los plásmidos utilizados y, posteriormente, se determinó la actividad β -galactosidasa tanto en filtro como en líquido.

3.5.1 Ensayo β -galactosidasa en filtro

El ensayo β -galactosidasa en filtro tiene como objetivo medir la actividad de la β -galactosidasa de una forma cualitativa [43]. El desarrollo del ensayo consistía en sembrar clones individuales en las condiciones de selección requeridas. Posteriormente, las células se transferían a un filtro de nitrocelulosa (*Millipore*) y se congelaban a -80°C para su permeabilización durante 1 h. A continuación se ponía el filtro en contacto con una solución de tampón Z [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y β -mercaptoetanol 2,7% (v/v)] y un sustrato artificial X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), 1 mg/mL (Roche). La reacción se llevaba a cabo a 30°C , observándose la aparición de color

azul verdoso, resultado de la acción de la β -galactosidasa, si la interacción física entre las dos proteínas estudiadas tenía lugar.

3.5.2 Ensayo β -galactosidasa en medio líquido

El ensayo β -galactosidasa en medio líquido tiene como fin medir la actividad de la β -galactosidasa de un modo cuantitativo. Una vez realizados los análisis en filtro, se realizó el ensayo en medio líquido por inoculación de, al menos, 6 de los transformantes obtenidos en el ensayo previo [44]. El procedimiento se llevaba a cabo con la cantidad de células equivalente a 0,5 unidades de OD=600 en 1 mL de tampón Z con 25 μ L de SDS 0,1% (p/v) y 25 μ L de cloroformo. Las células se rompían por agitación fuerte durante 20 s, y a continuación se añadía el sustrato, consistente en 200 μ L de ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosido, de Sigma Aldrich) 4 mg/mL y la reacción se detenía con 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M a tiempos controlados. La reacción tuvo lugar a 30°C. El color amarillo final se midió a A₄₂₀ después de centrifugar a 4000 r.p.m durante 4 min, para reparar los restos celulares y la fase de cloroformo. El resultado final se expresó en Unidades Miller, aplicando la siguiente transformación:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{DO_{420} \times 1000}{t \text{ (min)}} \times 2$$

3.6 Western Blot

3.6.1 Obtención de extractos de proteínas a partir de las levaduras transformantes

A partir de los mismos cultivos de los transformantes de levadura seleccionados para realizar los ensayos de doble híbrido, se tomó una cantidad de células equivalente a 1 unidad de OD=600 y se resuspendieron en 100 μ L de tampón de carga SB 2X [Tris-HCl 1M pH 6.8 125 mM, Glicerol 20%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.04 mg/mL, ditioneitol (DTT) 31 mg/mL]. Se transfirieron a tubos de rosca con 0.3 g de bolitas de vidrio (450 μ m de diámetro). La rotura celular se realizó mediante un método físico consistente en dos ciclos de ebullición (3 minutos) y agitación en vórtex (30 segundos). Los extractos se congelaron a -20 °C para su posterior procesamiento.

3.6.2 Análisis por SDS-PAGE y electrotransferencia

Para confirmar los niveles de expresión de las proteínas en los transformantes de levadura, éstas se analizaron mediante SDS-PAGE usando geles de una concentración 11% de acrilamida-bisacrilamida y grosor 1,5 mm. La electroforesis se realizó en un sistema mini-protean Electrophoresis System (Bio-Rad) a un voltaje constante de 120 V en un tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v).

Después de la separación, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, ProteanTM, 0,45 μ m) por electrotransferencia durante 90 min a una diferencia de potencial de 100 V en tampón compuesto por glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v).

Tras la transferencia, las membranas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con PBS con 3% de BSA, para bloquear lugares de unión a

proteínas libres. Los anticuerpos primarios, disueltos en TBS-T [50 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, pH 7,5 y 0,1% de Tween 20] con 3% de BSA se incubaron en agitación durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios disueltos en TBS-T con 2% leche desnatada en polvo durante al menos 1 hora. Después de otros tres lavados de 10 minutos en TBS-T, se visualizó la expresión proteica usando el sistema de detección de imágenes Odissey IR de LI-COR Biosciences. Las imágenes se analizaron con el software Image Studio Lite de la misma casa comercial.

3.6.3 Tinción Ponceau de la membrana de nitrocelulosa

La solución rojo Ponceau (0,5% Ponceau-S red, 1% ácido acético) permite una tinción reversible de las proteínas. La membrana de nitrocelulosa se mantiene unos minutos en la solución y, a continuación, se destiñe en agua destilada, lo que permite visualizar los marcadores de peso molecular y cada uno de los carriles transferidos. La intensidad de tinción de cada carril permite comprobar que todos los pocillos del gel de acrilamida se cargaron con una cantidad similar de muestra.

3.6.4 Anticuerpos empleados

En la inmunodetección fueron empleados anticuerpos primarios de Abcam (Cambridge, UK) contra LexA y de Sigma Aldrich (Missouri, EEUU) contra HA. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron *IRDyeR 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L)* e *IRDyeR 680LT Goat anti-Mouse IgG (H+L)* de *LI-COR Biosciences* (Lincoln, Nueva Inglaterra, EEUU), anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón, respectivamente.

3.7 Análisis estadístico

Los datos se expresan en medias con desviación estándar. La significación estadística de las diferencias entre grupos se evaluó con una prueba de t de Student, utilizando una distribución de dos colas. La significación ha sido calculada como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Resultados

4.1. Mutantes estudiados

La selección de mutantes a estudiar es la que se detalla en la Figura 10, mostrando que se trabajó con mutantes presentes tanto en el dominio CBD, como en el DSP, como en la región no perteneciente a ninguno de ellos.

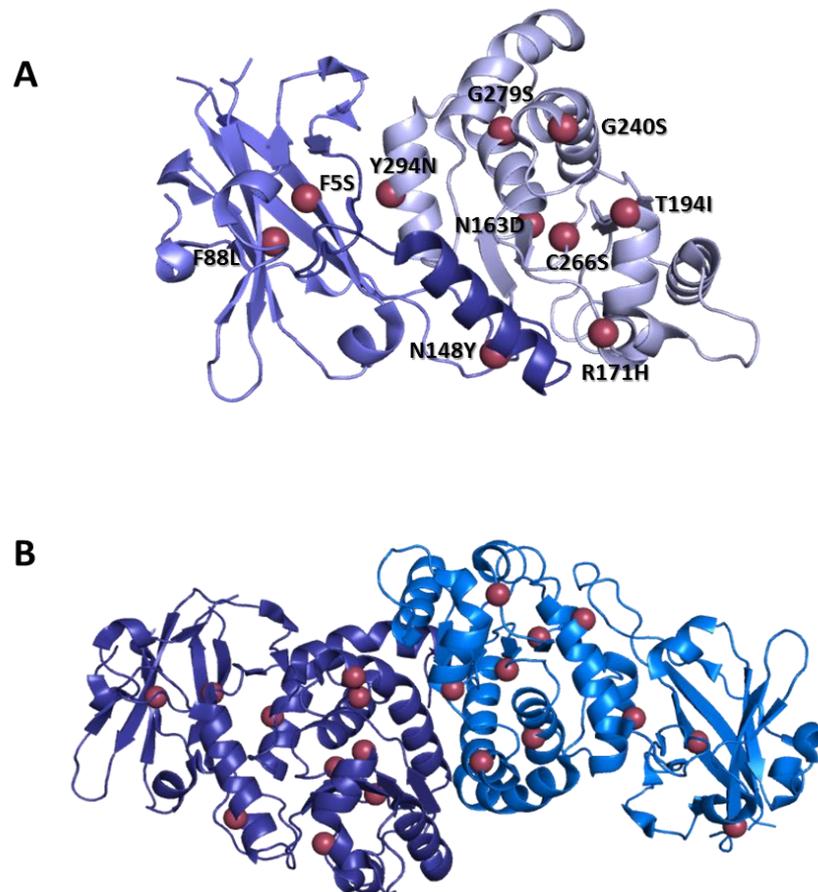


Figura 10. Estructura tridimensional de laforina humana. (A) Estructura tridimensional de laforina en su forma monomérica. Ésta está compuesta por un dominio CBD y un dominios DSP, señalados en dos tonos de morado. Las esferas rojas señalan los carbonos α de las mutaciones con las que se ha trabajado en este proyecto. **(B)** Estructura tridimensional de laforina humana en su forma homodimérica. Se representan en dos tonos de azul las dos moléculas antiparalelas que forman el dímero de laforina. Cada monómero está compuesto por un dominio CBD y un dominio DSP, dando lugar a una estructura tetramodular CBD1-DSP1-DSP2-CBD2. Las esferas rojas representan los carbonos α de las mutaciones estudiadas en este proyecto y dan una idea global de cómo éstas se disponen en el homodímero. Modelización de la estructura realizada con el programa PyMOL.

4.2. Estudios de interacción laforina-malina

La malina es una E3 ubiquitín ligasa que contiene un dominio RING amino-terminal y seis dominios NHL carboxiterminales que parecen formar un tipo de dominio de interacción proteico de tipo propulsor β [45]. Ha sido descrito, en numerosas ocasiones, que laforina y malina forman un complejo funcional y que laforina interacciona con sustratos que serán ubiquitinados por malina, pero esta interacción debe entenderse como dependiente de laforina y muchos de ellos son enzimas implicadas en el proceso de síntesis de glucógeno [26].

El complejo laforina-malina une y ubiquitina la isoforma muscular de la glucógeno sintasa y de R5/PTG, la subunidad encargada de dirigir la actividad de PP1 hacia el glucógeno. Muchas de estas afirmaciones se basan en experimentos realizados sobre cultivos celulares, pero recientemente, estos mismos ensayos realizados en modelos murinos de la enfermedad, tanto deficientes en malina como deficientes en laforina, han dado lugar a resultados contradictorios, no pudiendo llegar a una conclusión certera sobre el papel de este complejo funcional en la regulación de la homeostasis del glucógeno [26].

A pesar de esto, la interacción laforina-malina como integrantes de un complejo funcional regulador no puede negarse, y con el fin de ver cuáles de las mutaciones en pacientes afectaban a esta interacción, los análisis de doble híbrido se realizaron transformando la cepa de levadura THY-AP4 con las construcciones de laforina silvestre y los distintos mutantes fusionadas al dominio de unión al DNA LexA, y con construcciones de malina silvestre fusionada al dominio de activación del factor de transcripción Gal4 (GAD). Posteriormente, se determinó la actividad β -galactosidasa, primeramente realizando un ensayo cualitativo en filtro de nitrocelulosa como el que aparece en la Figura 11, y seguidamente con el ensayo cuantitativo en medio líquido, que daría valores de actividad en función de la absorbancia medida tras el cambio de color de la solución con levaduras lisadas y el sustrato de la enzima codificada por el gen reportero, tal y como se detalla en el apartado 3.5.2 de Materiales y métodos.

Se pueden observar diferencias en la capacidad de interacción de un modo cualitativo (Figura 11), puesto que algunos de los mutantes transferidos no presentan coloración azul-verdosa, indicando carencia total de interacción, como ocurre con mutantes como el Y294N. Igualmente, ninguno de los controles realizados para cada uno de los mutantes dio resultados de autoactivación, puesto que las fusiones LexA-laforina mutante tampoco presentaban coloración azul-verdosa cuando se transformaban con GADT7 vacío.

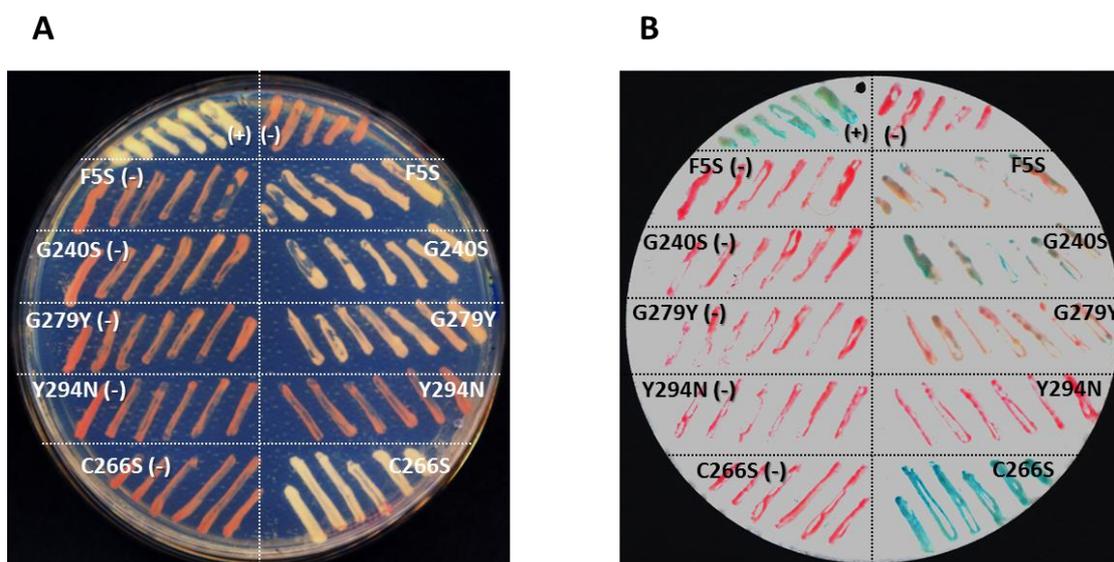


Figura 11. Interacción por doble híbrido de los mutantes de laforina con malina. Los controles se representan con los símbolos (+) y (-), haciendo referencia a la combinación de laforina y malina silvestre, y a LexA vacío frente a GAD-malina, respectivamente. **(A)** Colonias aisladas de los transformantes indicados en la figura. Se sembraron en placas con medio sintético completo (-Leu, -His) y se incubaron durante 36-48h a 30°C. **(B)** Los transformantes crecidos en (A) se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa, realizando a continuación el ensayo β -galactosidasa en filtro según se describe en el apartado 3.5.1 de Materiales y métodos. Cuando existe interacción los transformantes toman coloración azul-verdosa.

Atendiendo a los resultados, que pueden observarse en la Figura 12, los mutantes F88L, N148Y, N163D, R171H, T194I e Y294N pierden prácticamente por completo su capacidad de interacción con malina con respecto a la laforina silvestre. En orden creciente de interacción con malina, el mutante G279S conservaba un 30% de actividad respecto del silvestre. A continuación, F5S, con un 60% de actividad, y finalmente el mutante G240S con actividad β -galactosidasa similar al control. Resultaba particularmente interesante el caso del mutante C266S, una mutación de la cisteína catalítica del dominio DSP, cuya actividad β -galactosidasa y, por tanto, interacción con malina, prácticamente duplica la de laforina silvestre. Igualmente, se realizaron los correspondientes controles para cada uno de los mutantes en el ensayo β -galactosidasa en medio líquido, comprobando la falta de interacción, y por tanto, de autoactivación, que ya se había visto en el ensayo previo en filtro. El análisis estadístico de todos los resultados dio una significación de $p < 0.001$.

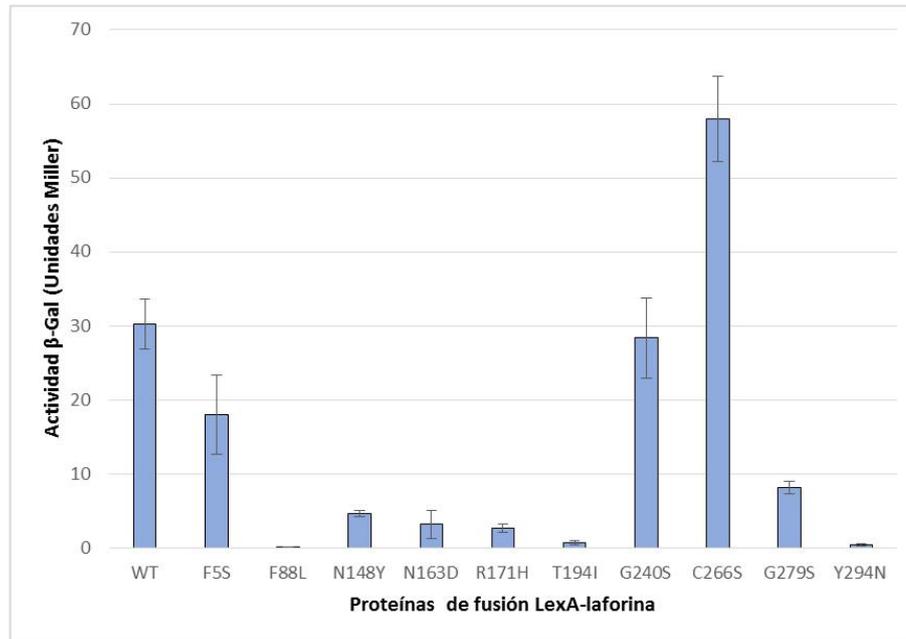
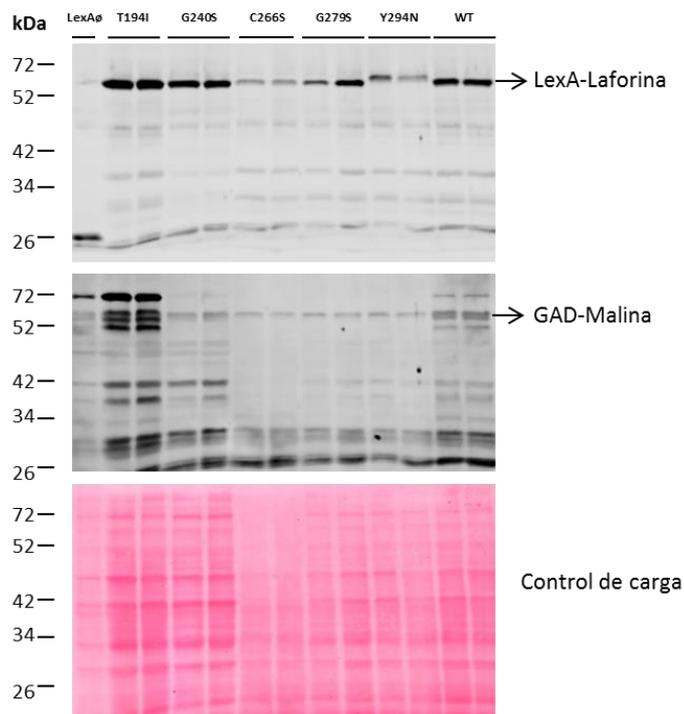
A**B**

Figura 12. Interacción de los mutantes de laforina con malina. La cepa THY-AP4 de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con pEG202-LexA-laforina silvestre (WT) o con las mutadas. Por otra parte, se empleó pACT2, que contiene el dominio GAD de activación, fusionado a malina. **(A)** Interacción de laforina con malina: actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) correspondiente a la interacción entre laforina WT o laforina mutante con malina, según se indica en el diagrama de barras. Para realizar el gráfico también se analizaron los correspondientes controles con los mutantes de laforina indicados. **(B)** Imagen representativa del análisis por Western Blot de los extractos crudos usando los anticuerpos anti LexA y anti HA. Como control de carga se ha incluido una tinción Ponceau de las membranas. Los resultados obtenidos para los mutantes F5S, F88L, N148Y, N163D y R171H fueron similares a los que aparecen en la imagen.

4.3 Estudios de interacción laforina-R5/PTG

La importancia de R5/PTG radica en que forma parte de un conjunto de subunidades reguladoras de PP1 en el metabolismo del glucógeno. Esta designación se acuñó al descubrir un complejo proteico asociado a partículas de glucógeno en músculo esquelético de conejo [46]. A partir de este hallazgo se describió la primera subunidad reguladora de glucógeno, la GM/R_{GL}. Con el tiempo se ha visto que esta primera subunidad descrita forma parte de una familia de siete miembros denominados: GM, GL, R5/PTG, R6/R3D, R3E, R3F y R3G.

En cuanto a R5/PTG, esta proteína se expresa de forma ubicua en todos los tejidos. A nivel transcripcional, R5/PTG es sensible a la regulación hormonal por insulina/adrenalina [47], y su nivel proteico está regulado por AMPK, también denominado “sensor metabólico celular”, que es capaz de fosforilar a R5/PTG etiquetándola para su degradación [48].

Al igual que el resto de subunidades de la familia, R5/PTG interaccionará tanto con el sustrato a desfosforilar como con el glucógeno. Además, R5/PTG se unirá a PP1 e interaccionará con laforina, que llevará a R5/PTG hasta malina, encargada de ubiquitinarla para inducir su degradación [49].

Con el fin de analizar cómo afectaban las mutaciones en laforina a la interacción con R5/PTG, los análisis de doble híbrido se llevaron a cabo esta vez transformando la cepa de levadura THY-AP4 con las construcciones de laforina silvestre y los distintos mutantes fusionadas al dominio de unión al DNA LexA y con construcciones de R5/PTG fusionada al dominio de activación del factor de transcripción Gal4(GAD) y, como en los anteriores ensayos, se determinó la actividad β-galactosidasa, en primer lugar realizando un ensayo cualitativo en filtro de nitrocelulosa, detallado en la Figura 13 y seguidamente con el ensayo cuantitativo en medio líquido.

Atendiendo a los resultados mostrados en la Figura 13, y al igual que ocurría en las interacciones con malina, ya se podía observar que algunos de los mutantes no poseían interacción en absoluto, hecho que se ponía de manifiesto con la ausencia total de coloración azul-verdosa, como ocurría con mutantes como el F88L y T194I. Del mismo modo que en la interacción con malina, se comprobó que los controles negativos no mostraban resultados de autoactivación, pues se apreciaba una total ausencia de coloración azul-verdosa en ellos.

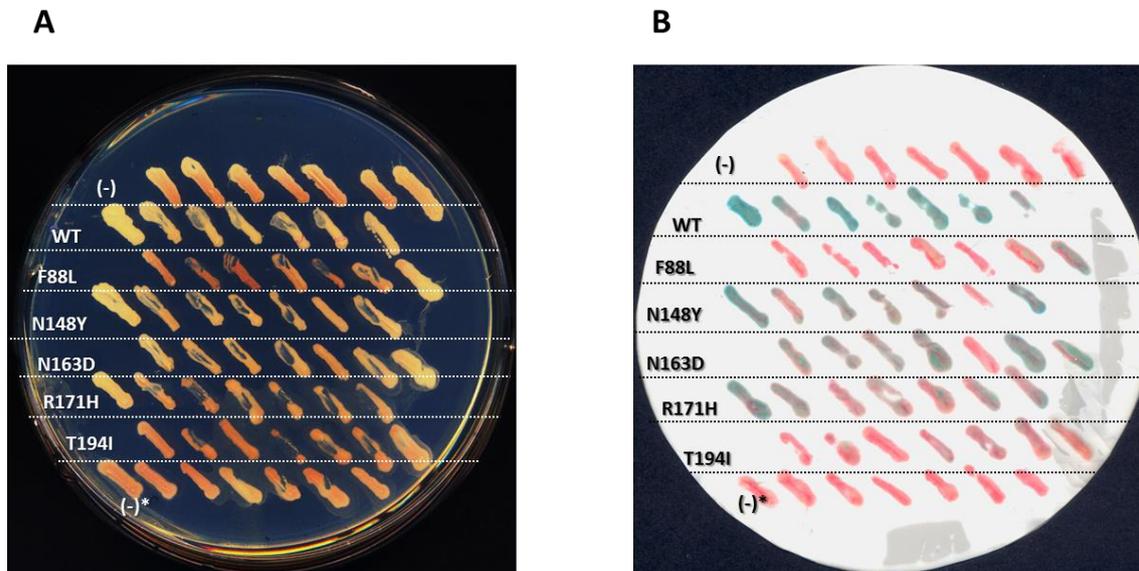


Figura 13. Interacción por doble híbrido de los mutantes de laforina con R5/PTG. Los controles se representan con los símbolos (-) y (-)*, haciendo referencia a los controles negativos, que llevan uno de los vectores de la interacción testada vacío, pEG202 y PACT1IR5, respectivamente. **(A)** Colonias aisladas de los transformantes indicados en la figura. Se sembraron en placas con medio sintético completo (-Leu, -His) y se incubaron durante 36-48h a 30°C. **(B)** Los transformantes crecidos en (A) se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa, realizando a continuación el ensayo β -galactosidasa en filtro según se describe en el apartado 3.5.1 de Materiales y métodos. Cuando existe interacción los transformantes toman coloración azul-verdosa.

En este caso, los mutantes que pierden interacción de forma más significativa con R5/PTG son F88L, R171H, T194Y e Y294N. Por otra parte, los mutantes N148Y, N163D y G279S también pierden considerablemente su actividad β -galactosidasa, pero conservan de un 13% a 42% de actividad. También hay mutantes que prácticamente se mantienen en valores de actividad similares a laforina silvestre, como el F5S y el G240S, aunque sí es cierto que este último pierde un 16,4% de actividad. Además, resulta realmente significativo el caso del mutante catalíticamente inactivo C266S, pues presenta una interacción con R5/PTG que duplica la del fenotipo silvestre (Figura 14 A).

Además, y como en todas las interacciones analizadas, se comprobó la expresión correcta de las proteínas del ensayo, para poder concluir que los resultados de la interacción analizada eran debidos a la naturaleza de las proteínas que interaccionaban y no a una falta de expresión de las mismas (Figura 14B). El análisis estadístico de todos los resultados, también dio en este caso una significación de $p < 0.001$.

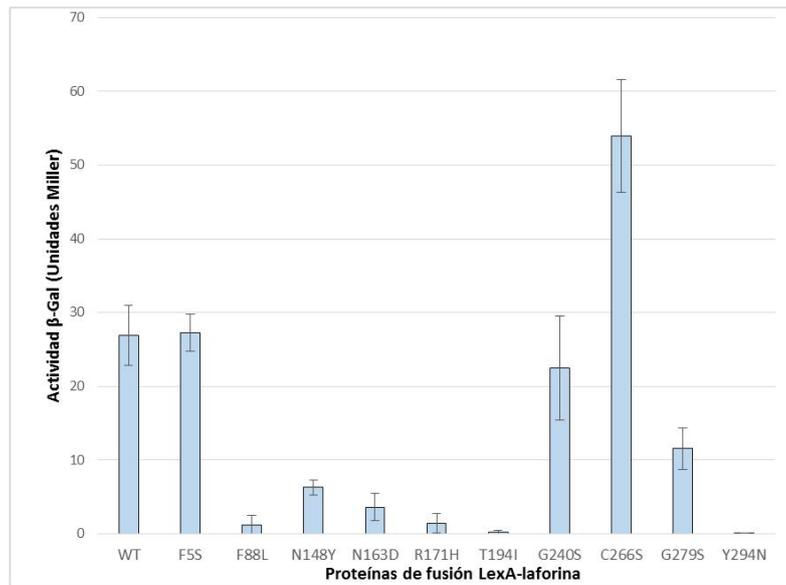
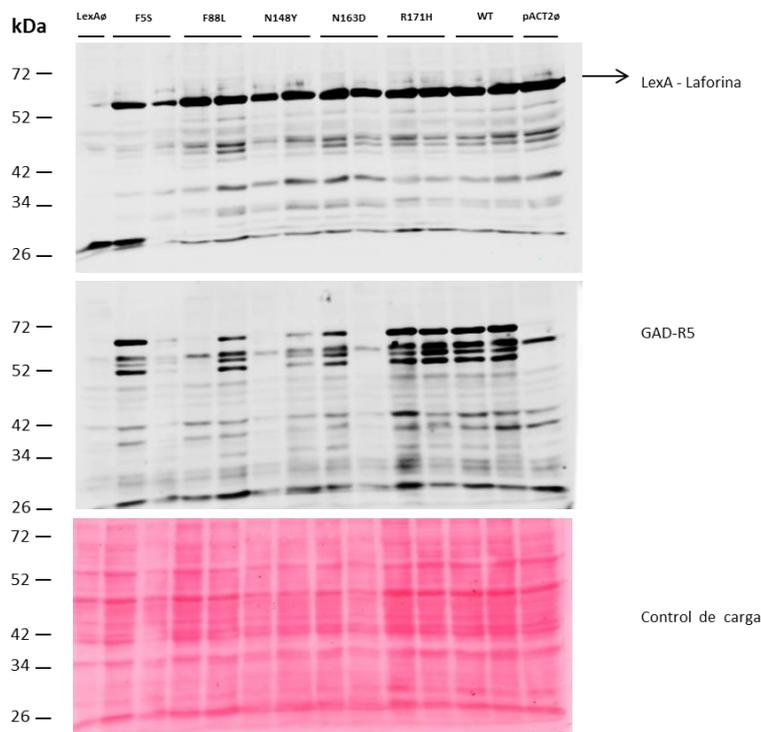
A**B**

Figura 14. Interacción de los mutantes de laforina con R5/PTG. La cepa THY-AP4 de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con pEG202-LexA-laforina silvestre (WT) o con las mutadas. Por otra parte, se empleó pACT2, que contiene el dominio GAD de activación, fusionado a R5/PTG. **(A)** Interacción de laforina con R5/PTG: actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) correspondiente a la interacción entre laforina WT o laforina mutante la subunidad R5/PTG, según se indica en el diagrama de barras. Para realizar el gráfico también se analizaron los correspondientes controles con los mutantes de laforina indicados. **(B)** Imagen representativa del análisis por Western Blot de los extractos crudos usando los anticuerpos anti LexA y anti HA. Como control de carga se ha incluido una tinción Ponceau de las membranas. Los resultados obtenidos para los mutantes T194I, G240S, C266S, G279S e Y294N fueron similares a los observados en la figura.

4.4 Comparativa de la interacción de laforina con los sustratos en estudio

A partir de los datos de interacción de laforina con los dos sustratos estudiados previamente, es interesante mostrar la comparativa entre ambos para cada mutación (Figura 15). Aunque se dan algunas excepciones, la norma general es que una determinada mutación da unidades de actividad similares para la interacción con ambos sustratos. Esto puede sugerir, en primer lugar, que la laforina es una proteína considerablemente inestable, y que estas mutaciones missense alteran su conformación hasta el punto de dificultar dos de sus interacciones más importantes en el proceso de regulación de la homeostasis del glucógeno; y en segundo lugar, que tal vez las mutaciones afectan de forma similar porque realmente los sitios de interacción o el sitio de interacción con estos sustratos son realmente dependientes de la estabilidad completa de la molécula, podría ser que fueran el mismo, o bien que quedaran muy cerca espacialmente.

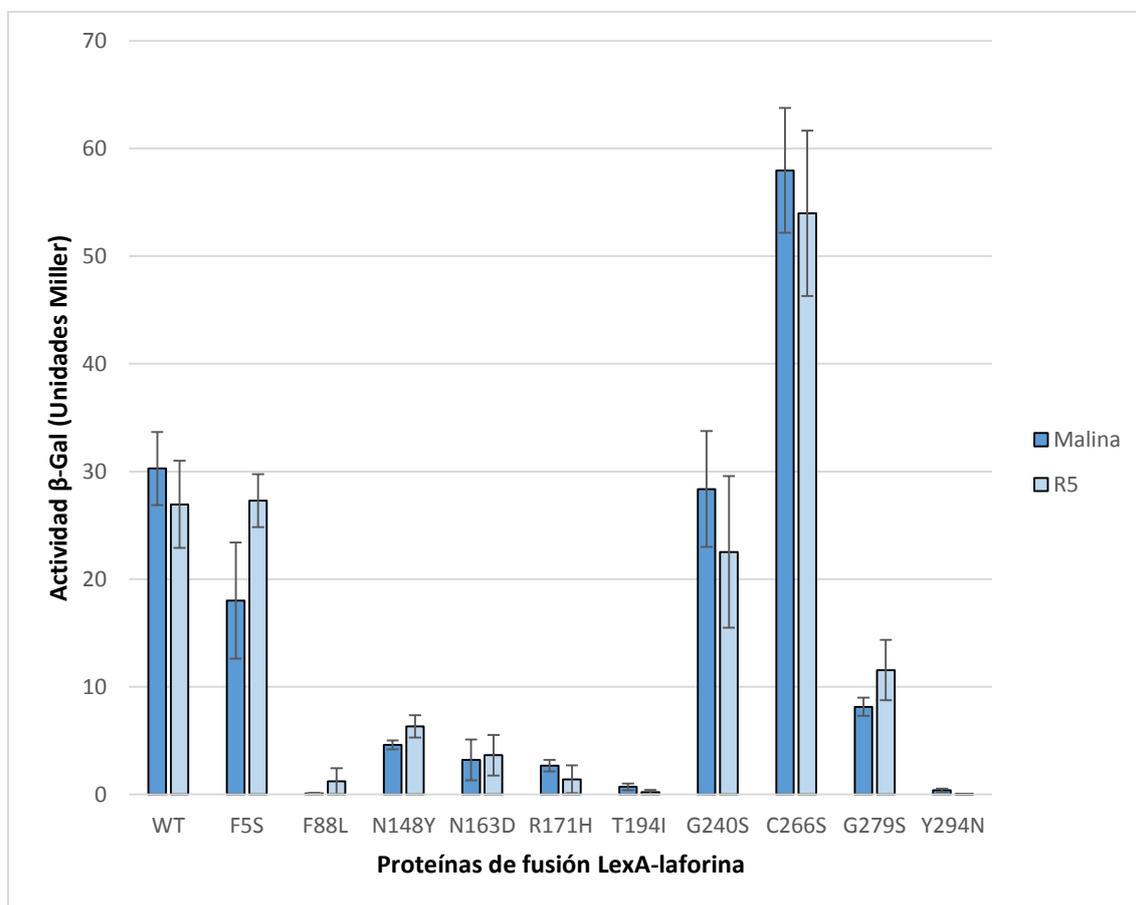


Figura 15. Interacción de los mutantes de laforina con malina y R5/PTG. Datos conjuntos obtenidos a partir de los ensayos de doble híbrido en medio líquido correspondientes a las interacciones de laforina con malina y R5.

4.5 Ensayos de homodimerización

4.5.1 Subclonación de los mutantes disponibles en el vector pGADT7

Para poder llevar a cabo los ensayos de homodimerización, fue necesario insertar los ORF de los respectivos mutantes en pGADT7. Para ello, se digirió este plásmido de destino con *Bam*HI y *Xho*I y el plásmido pEG202-LexA-laforina con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Se purificaron los insertos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y se desfosforiló el vector para evitar que las moléculas del plásmido digeridas religaran. Después de purificar y realizar la reacción de ligación se seleccionaron los plásmidos en células *E.coli* DH5 α . Posteriormente, se comprobó el éxito de la subclonación digiriendo con la enzima de restricción *Sma*I, que en el vector vacío daría lugar a un único fragmento de 7988 bp y en el vector con inserto generaría dos fragmentos de 947 bp y 8024 bp. En relación a la Figura 16, pueden observarse casos en los que el inserto se incorpora con éxito al vector receptor, como es el caso de los carriles 1, 2 y 5; y otros en los que éste no se ha introducido, como ocurre con los carriles 3 y 4. Una vez los fragmentos correspondientes a los ORF de laforina se incluyeron en el pGADT7, ya se disponía de todos los mutantes fusionados tanto al dominio LexA de unión al DNA, como al dominio activador GAD, por lo que se pudo proceder a analizar la homodimerización, pues ya se contaba con los componentes necesarios para reconstituir el factor de transcripción en caso de haber interacción. En la Figura 18, se muestra un diagrama de los plásmidos empleados en la subclonación.

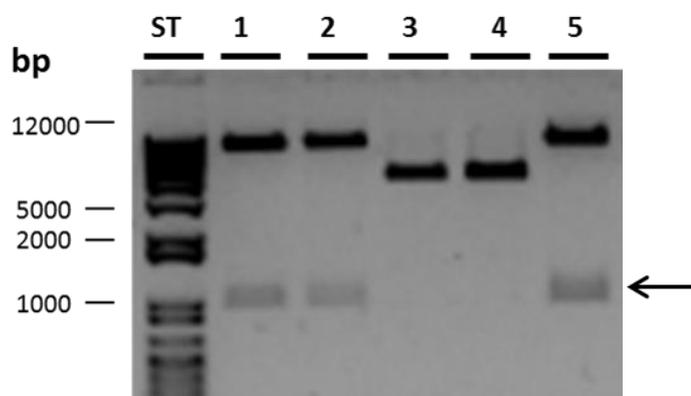


Figura 16. Obtención de mutantes de laforina como fusión a GAD. Electroforesis en agarosa 0,7% de comprobación de subclonación de mutantes de laforina en el vector pGADT7. Digestión enzimática con *Sma*I representativa, con algunos de los clones obtenidos, que son los carriles numerados del 1 al 5. La flecha señala la banda de 947 pb, que se obtiene si la ligación ha tenido éxito. ST es el carril correspondiente al marcador estándar de tamaño de DNA en pares de bases.

No obstante, se tuvo que proceder, primeramente, a la subclonación del mutante de laforina N163D en pEG202, dado que se disponía de dicha fusión en un vector distinto al de los otros mutantes en estudio, para lo cual se digirió este plásmido inicial con la combinación de enzimas de restricción *Bam*HI-*Xho*I que liberaba el ORF completo de laforina N163D en fase para su subclonación en pEG202, digerido con las

mismas enzimas de restricción. Se purificaron los insertos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y se desfosforiló el vector. Como en el caso anterior, tras purificar y realizar la reacción de ligación se seleccionaron los plásmidos en células *E.coli DH5α*. Posteriormente, se comprobó el éxito de la subclonación digiriendo también con la enzima *Sma I*, que en el vector vacío daría lugar a un único fragmento de 7988 bp y en el vector con inserto generaría dos fragmentos de 947 bp y 8024 bp (Figura 17). En la Figura 17, se muestra la imagen de un gel de agarosa representativo de la comprobación de la ligación.

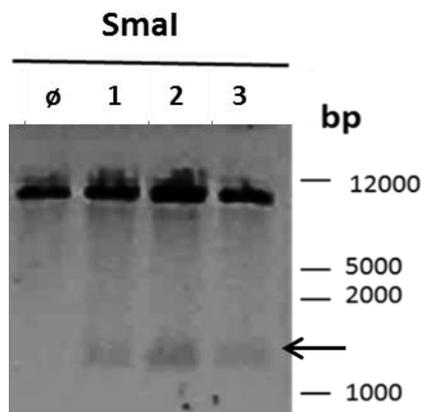


Figura 17. Obtención de mutantes de laforina como fusión a GAD. Electroforesis en gel de agarosa 0,7% de comprobación de la subclonación del mutante N163D en el vector pGADT7. Los carriles numerados del 1 al 3 corresponden a la digestión del plásmido de diferentes clones con *SmaI*. La flecha señala la banda de 947 pb, que se obtiene si la ligación ha tenido éxito. El símbolo ∅ representa el vector vacío.

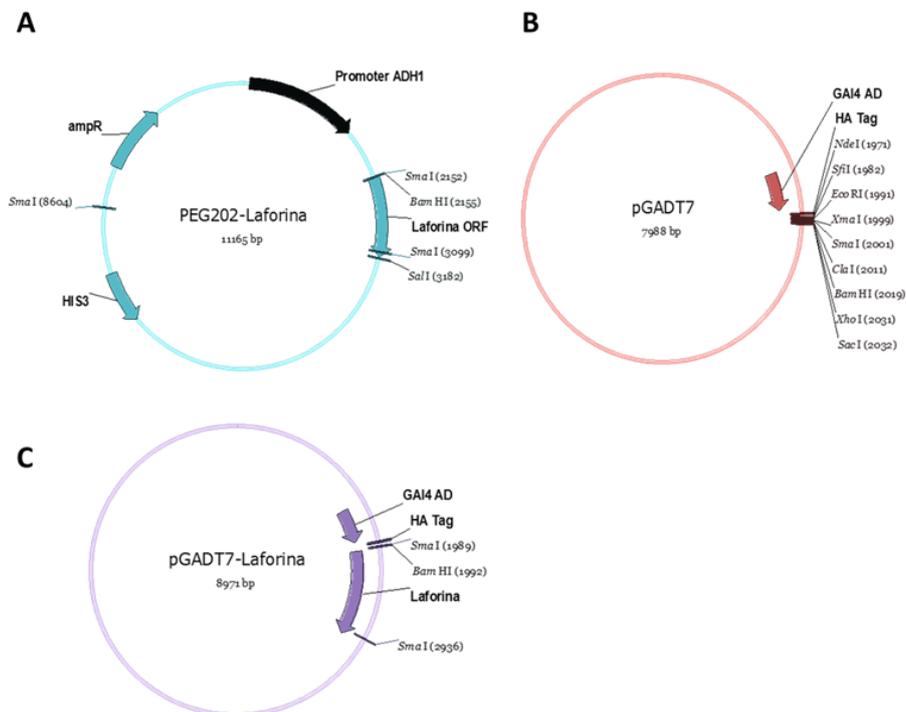


Figura 18. Diagrama de los plásmidos empleados en el subclonaje de los mutantes disponibles en el vector receptor pGADT7 realizados con el software Vector NTI. (A) Vector inicial pEG202-Laforina. (B) Plásmido receptor pGADT7. (C) Vector final pGADT7-Laforina.

4.5.2 Estudio de la capacidad de homodimerización de los mutantes testados.

Se ha elucidado recientemente que laforina actúa como dímero en su forma funcional [25]. Esta capacidad de dimerización cobra importancia en referencia a su unión al sustrato, pues la unión de éste a una de las moléculas del dímero favorece la unión a la otra molécula, es decir, posee un funcionamiento cooperativo, por ello, la presencia de mutaciones en laforina podría alterar esta unión y tener alguna repercusión en la patología de la enfermedad.

Con el fin de analizar cómo afectaban las mutaciones a estudiar en la homodimerización de laforina, se llevaron a cabo análisis de interacción mediante doble híbrido en levadura, atendiendo al procedimiento detallado en Materiales y métodos. Se transformó la cepa de levadura THY-AP4 con las construcciones de laforina silvestre y los distintos mutantes fusionadas tanto al dominio de unión al DNA LexA como al dominio de activación del factor de transcripción Gal4(GAD) y se midió la intensidad de la unión de cada interacción interrogada por determinación de la actividad β -galactosidasa, en primer lugar realizando un ensayo cualitativo en filtro de nitrocelulosa, detallado en la Figura 19, y seguidamente con el ensayo cuantitativo en medio líquido.

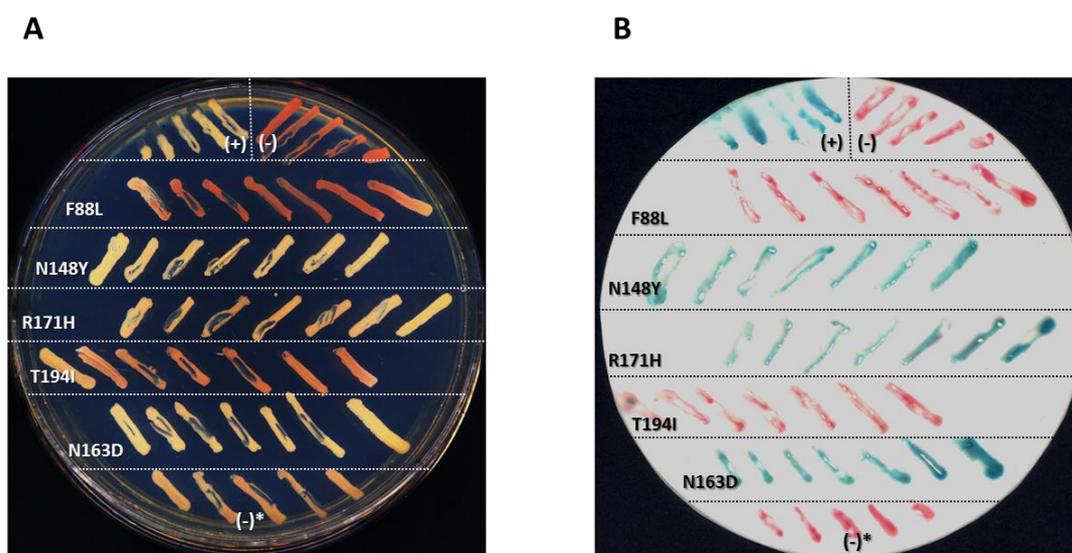
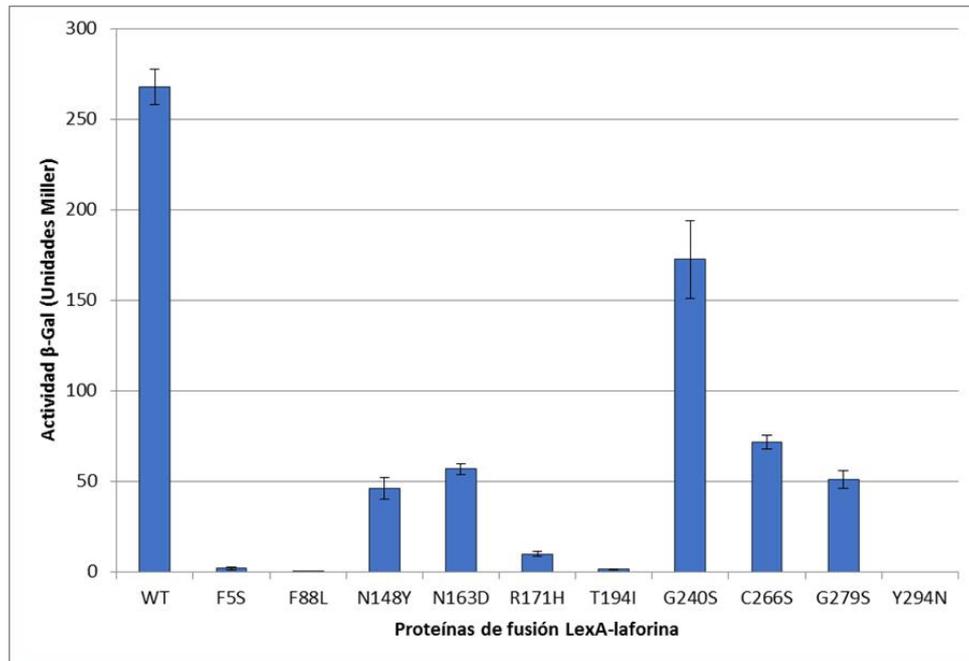


Figura 19. Ensayo de actividad β -galactosidasa en filtro (cualitativo) para estudiar la capacidad de homodimerización de algunos mutantes de laforina. (A) El primer paso del ensayo consiste en sembrar colonias de transformantes siguiendo patrones similares a los detallados en la imagen. **(B)** Posteriormente, este patrón se transfiere a un filtro de nitrocelulosa y se añadirá el sustrato de la β -galactosidasa, llevando a una variación de color a azul en caso de darse interacción entre las proteína interrogadas.

Como puede apreciarse en la Figura 19 de forma cualitativa, y al igual que en las anteriores interacciones estudiadas, ya es posible elucidar a simple vista cuáles son los mutantes que pierden por completo la capacidad de homodimerizar, manifestándose esto en forma de falta de coloración azul-verdosa. Este es, por ejemplo, el caso de los mutantes F88L y T194I. Al igual que en las interacciones previas, se realizaron los controles correspondientes para descartar que los mutantes estudiados tuviesen capacidad de autoactivación, confirmándose de nuevo este hecho.

En referencia al ensayo cuantitativo de actividad β -galactosidasa en medio líquido al que hace referencia la Figura 20, los mutantes N148Y, N163D, C266S y G279S conservan entre un 17-27% de capacidad de homodimerización con respecto al silvestre. El mutante G240S es el único que, aunque también ve disminuida la interacción consigo mismo, conserva el valor más alto de todos los mutantes estudiados, un 65% respecto del silvestre. Asimismo, se comprobó por western blot que todas las proteínas se expresaban a niveles similares (Figura 20B).

A



B

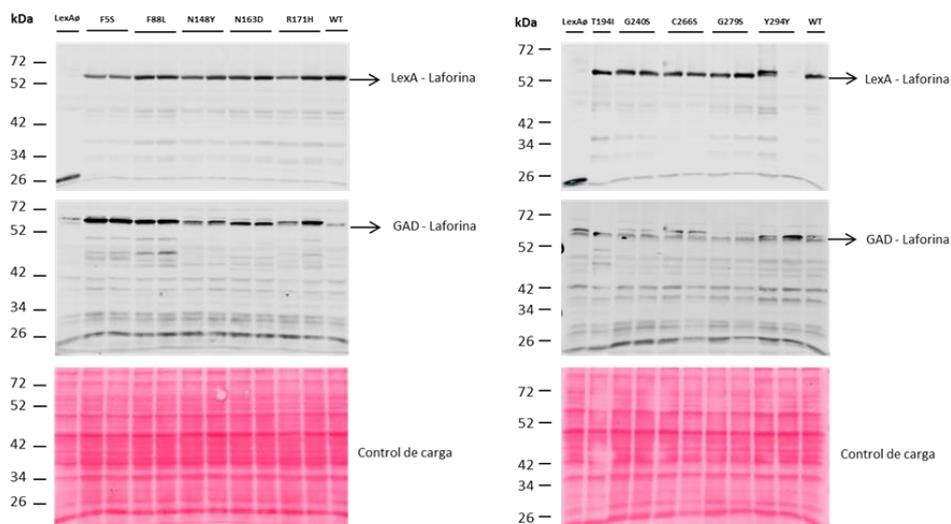


Figura 20. Interacción de los mutantes de laforina consigo mismos. La cepa THY-AP4 de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con pEG202-LexA-laforina silvestre (WT) o con las mutadas. Por otra parte, se hizo lo mismo con GAD-laforina silvestre y con las mutadas. **(A)** Homodimerización de laforina: actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) correspondiente a la interacción entre laforina WT o laforina mutante consigo mismas, según se indica en el diagrama de barras. Para realizar el gráfico también se analizaron los correspondientes controles con LexA y GAD vacíos. **(B)** Análisis por Western Blot de los extractos crudos usando los anticuerpos anti LexA y anti HA. Como control de carga se ha incluido una tinción Ponceau de las membranas.

4.6 Heterodimerización

Para profundizar en la caracterización de estos mutantes se realizaron también ensayos de heterodimerización, es decir, interacción con la laforina silvestre, de algunos de los mutantes. Aunque esta interacción no se puede dar de forma natural en un paciente de Lafora, dado que se trata de una alteración autosómica recesiva, este ensayo podría proporcionar información de carácter estructural. Por ello, se seleccionaron dos mutantes, el F88L, que había perdido totalmente la capacidad de homodimerizar, y N163D, que aún conservaba muy parcialmente algo de su capacidad de formar dímeros. Los resultados mostraron que ninguno de los mutantes recuperó la capacidad de formar dímeros con la forma silvestre de laforina (Figura 21).

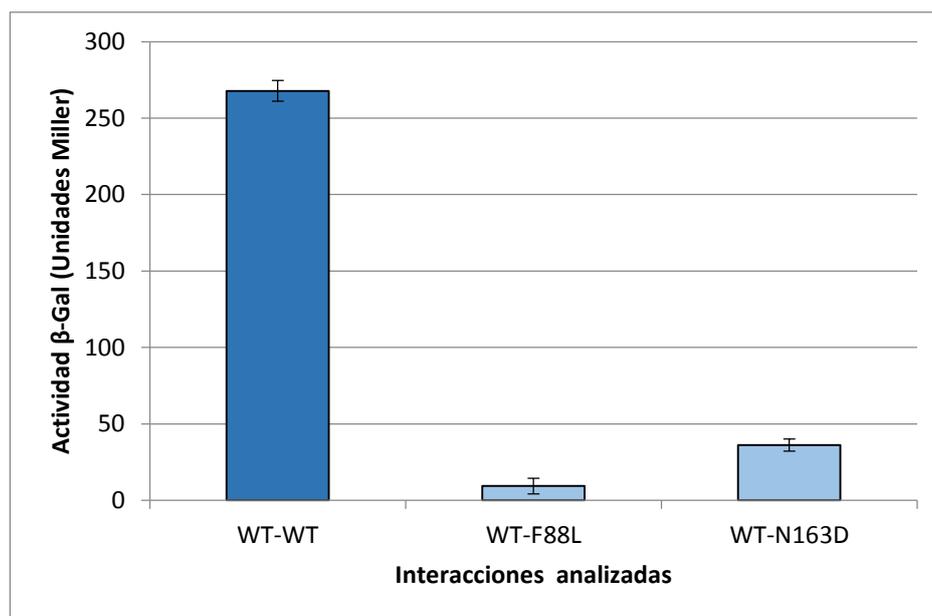


Figura 21. Interacción de laforina silvestre (WT) con los mutantes F88L y N163D. La cepa THY-AP4 de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con pEG202-LexA-laforina silvestre (WT) y pGADT7-laforina silvestre (interacción representada con WT-WT). Asimismo, se transformó con pEG202-laforina silvestre y cada una de las fusiones a GAD indicadas, pGADT7-laforina F88L (WT-F88L) y pGADT7-laforina N163D (WT-N163D).

5. Discusión

En este trabajo se han estudiado una serie de mutaciones de cambio aminoacídico en la laforina descritas en pacientes para caracterizar cómo pueden afectar a su interacción con sustratos (malina y R5/PTG) o a la capacidad de formar dímeros. Para proceder a la discusión de este proyecto, se comentará individualmente cada mutación analizada. Se describirá cuál es el cambio aminoacídico y cómo esto afecta a la región estructural en la que localiza la mutación y, en consecuencia, a la interacción con los sustratos y a la homodimerización. Además, se intentará buscar una relación entre la mutación comentada y cómo se ve reflejada en la sintomatología de los pacientes portadores, en los casos en los que se describa el cuadro clínico asociado a dicha mutación en concreto.

Por orden de secuencia, la primera mutación estudiada fue F5S. Este cambio aminoacídico de fenilalanina por serina se encuentra enmarcado en el dominio CBD, y supone el cambio de un aminoácido apolar aromático de gran tamaño, por uno polar y de tamaño muy reducido en comparación. Por lo que respecta a su interacción con

malina, se conserva un 60% de actividad β -galactosidasa respecto al fenotipo silvestre y mantiene completamente la interacción con R5/PTG. Esto podría explicarse de un modo sencillo atendiendo a que el CBD podría no participar de manera directa en las interacciones físicas con estos dos sustratos, con lo cual sus capacidades de interacción no deberían verse mermadas. No obstante, esta pequeña pérdida de actividad en la interacción con la malina puede verse causada por el cambio aminoacídico, pues al cambiar considerablemente la naturaleza química con respecto al aminoácido originalmente presente, podría haber una ligera desestabilización de cargas que afecte a la estructura de laforina y en consecuencia a esta interacción. Cabe destacar que está descrito que laforina es una proteína que, al menos *in vitro*, agrega con facilidad y es bastante inestable, por lo que pequeños cambios aminoacídicos que no supongan grandes cambios en propiedades físico-químicas poder terminar alterándola considerablemente o impidiendo su correcta expresión. No obstante, su sobreexpresión en levaduras produce proteína en cantidad suficiente como para corroborar que la expresión de la proteína es la correcta (Figuras 12, 14 y 21; paneles B). Además, por lo que respecta a la homodimerización, este mutante pierde la capacidad de homodimerizar, así como la de heterodimerizar, lo que indica que aunque espacialmente se localiza bastante alejada de los dominios DSP, donde se producen los contactos para formar dímeros, es una posición importante para la estabilización del dímero. Este hecho reforzaría la idea de que la desestabilización estructural de la proteína conlleva problemas en algunas de sus interacciones, aunque la mutación no afecte directamente a las zonas de contacto. No se dispone de datos sobre sintomatología de los pacientes portadores de esta mutación, por lo que se supone que el transcurso de la enfermedad es el que se describe de modo general [2]. Tampoco se sabe si esta mutación conlleva la pérdida de la actividad fosfatasa. Cuando se disponga de estos datos, podrá elucidarse si la enfermedad es causada por esta pérdida de interacción, por la pérdida de actividad fosfatasa, o una combinación de ambas.

La siguiente mutación analizada fue F88L, en este caso, el cambio de una fenilalanina por una leucina, también en el dominio CBD, supone el paso de un aminoácido apolar aromático de gran tamaño, a uno apolar alifático. Este mutante pierde tanto la capacidad de interaccionar con malina y con R5/PTG, como la de homodimerizar. El hecho de que todas las interacciones interrogadas se vean sustancialmente mermadas indica que este aminoácido sustituido es esencial para el establecimiento de una correcta estructura de laforina y con ello, de su capacidad reactiva. Se pensó que la falta del anillo aromático en F88L podría estar afectando a la integridad estructural del sitio de unión a polisacáridos alterando la posición de K87 [14]. No obstante, estudios posteriores revelaron que no existía disminución en la capacidad de unión al glucógeno aberrante que conforma los LB [50]. Con lo cual, aunque la mutación se localiza en el dominio de unión a carbohidratos (Figura 22), la función de regulación de la cantidad de glucógeno celular aberrante que se le atribuye a laforina no debería verse afectada de forma directa por alteraciones en este dominio, sino que lo que está fallando aquí es la unión a malina y a la subunidad R5/PTG, que resulta en problemas en los pasos siguientes del proceso de regulación de la homeostasis del glucógeno. Esta idea se refuerza al saber que el mutante no presenta diferencias en la localización subcelular con respecto a laforina silvestre, ambas dando un patrón de aparición disperso en el citoplasma [51], sugiriendo que ahí es donde se une a los poliglucosanos para marcar su degradación. Como todavía no se ha elucidado cristalográficamente la naturaleza de la unión entre laforina y malina, ni entre laforina y R5/PTG, no se sabe con exactitud cómo este cambio en el CBD puede

estar afectando a estas uniones. Por el momento, la literatura no da información especial acerca de los enfermos portadores de esta mutación, con lo cual se supone que poseerán el cuadro clínico clásico de la enfermedad [2]. Y aunque sí se une a carbohidratos, no se dispone de datos sobre si mantiene o no actividad fosfatasa, con lo cual con esta mutación tampoco se puede concluir que la enfermedad venga provocada por esta pérdida completa de interacciones o por la pérdida de actividad fosfatasa aunque sí es cierto que esta pérdida sustancial de la interacción con dos sustratos tan importantes como son malina y R5/PTG parece ser un indicativo importante a la hora de explicar la presencia de LD en estos pacientes.

Con la mutación N148Y se da la particularidad de que no pertenece a ninguno de los dos grandes dominios de la laforina, si no que, por secuencia, se localiza entre ambos. El cambio de asparagina a tirosina supone el paso de un aminoácido polar de pequeño tamaño, a un aminoácido aromático. Conserva aproximadamente de un 15 a un 20% de interacción tanto con malina como con R5/PTG, y el mismo porcentaje de interacción consigo mismo. Con lo cual, con esta mutación, se está produciendo una alteración que afecta de la misma forma a los tres tipos de interacción estudiadas, disminuyendo considerablemente sus capacidades de interacción. Como puede observarse en la Figura 22, la mutación se localiza en una región superficial de la molécula, y posiblemente la aparición de un aminoácido de mayor tamaño desestabilice considerablemente la proteína. En el caso de esta mutación sí que se dispone de datos clínicos asociados, que describen como primeros síntomas las convulsiones tónico-clónicas y sacudidas mioclónicas, seguidas de decline cognitivo, problemas visuales, problemas de comportamiento y ataxia, siendo éste un cuadro clínico clásico [52]. Una posible hipótesis que explique lo que ocurre con esta mutación podría ser que N148Y forme parte de alguno de los dominios funcionales adicionales de unión a otros sustratos, todavía no descritos, que se prevé que tenga la molécula de laforina, alterando por ello la interacción con malina y R5/PTG; otra podría ceñirse, como ya se ha mencionado, a una desestabilización de la misma que podría afectar considerablemente a todas sus interacciones.

Los mutantes restantes de este trabajo se localizan en el dominio DSP. La primera mutación del set es N163D, cuyo cambio de asparagina a aspártico está sustituyendo un aminoácido polar por de carácter ácido. Esta mutación se localiza a la entrada del bolsillo con la cisteína catalítica C266 (Figura 22). En cuanto a sus propiedades bioquímicas, este mutante posee las mismas propiedades de unión a carbohidratos que la laforina silvestre y su actividad fosfatasa no se ve alterada [53]. Pierde la habilidad de interaccionar con R5/PTG y con malina, y conserva un 20% de capacidad de homodimerización. Los datos de sintomatología de los pacientes portadores de esta mutación muestran que la progresión de la enfermedad es más lenta, lo que podría estar relacionado con el mantenimiento de las funciones de unión a carbohidratos y actividad fosfatasa. Esto sugeriría que estas funciones son fundamentales para el complejo laforina-malina, dado que su conservación podría determinar la lentitud de la evolución de los síntomas de la enfermedad.

La siguiente mutación estudiada fue R171H, también presente en el dominio DSP, y cuyo cambio aminoacídico consiste en la sustitución de una arginina, aminoácido básico con carga positiva, por la histidina, que también es básico pero con cadena lateral diferente. Esto, como ya se ha visto con la mutación F88L, puede llevar a una desestructuración de la proteína que lleve a la pérdida de la capacidad de interacción en las tres combinaciones analizadas. De hecho, se ha visto que efectivamente ocurre, pues el mutante pierde la capacidad de interacción con malina,

con R5/PTG y consigo mismo. Existen datos clínicos de pacientes portadores de esta mutación, que describen que los síntomas comienzan con las convulsiones tónico-clónicas o sacudidas mioclónicas, prosiguen con decline cognitivo y prosiguen con ataxia, demencia y mutismo, para finalmente dar lugar a la atrofia del sistema gástrico y digestivo; lo que podría definirse como otra manifestación clásica de la enfermedad de Lafora [51]. Se ha descrito que en células portadoras de la mutación, aparecen agregados citoplásmicos ubiquitina positivos formados por proteínas defectivas adyacentes al núcleo, sugiriendo que van a degradación pero acumulándose en el citoplasma. Además, el mutante pierde la actividad fosfatasa [25], con lo cual tanto su función como las interacciones están realmente alteradas.

Otra mutación del dominio DSP es T194I, en la cual el cambio aminoacídico de treonina a isoleucina supone el paso de un aminoácido polar neutro de tamaño muy reducido a otro apolar alifático. Los resultados indican que la capacidad de interacción de este mutante con malina, R5/PTG y con él mismo se ven sustancialmente reducidas. Esta mutación en el DSP también trae consigo la pérdida de la actividad fosfatasa e incluso afecta a la unión al glucógeno, a pesar de no encontrarse en el CBM [36]. Por lo que no solo está alterando el dominio DSP, sino que también está desestabilizando la estructura global de la proteína y un gran número de sus funciones se están viendo alteradas. Del mismo modo que ocurría con R171H, este mutante también da lugar a agregados citoplasmáticos de proteínas ubiquitinadas mal plegadas adyacentes al núcleo. En definitiva, este mutante parece tener efectos muy similares al R171H.

Otra mutación interesante es la G240S, que también forma parte del dominio DSP. El cambio aminoacídico, en este caso, no supone un cambio en la naturaleza química, simplemente se intercambia glicina por serina, ambos aminoácidos polares y neutros de muy pequeño tamaño. De no causar síntomas, esta mutación podría entenderse como un simple polimorfismo. No obstante, un estudio en pacientes de Lafora reveló que ninguno de los pacientes control poseía dicha mutación y que por tanto no podía considerársele polimorfismo [54] [55] pero puede que este cambio altere otro dominio de laforina crucial para su correcto funcionamiento. De hecho, como se ha comentado previamente, se espera que laforina posea dominios funcionales adicionales involucrados en la interacción con subunidades reguladoras. En este caso, el mutante conserva un 65% de capacidad de homodimerización, e interacciona con malina y R5/PTG de forma similar a laforina silvestre (94% y 84% respectivamente). G240S pierde la actividad fosfatasa [25]. Además los datos del paciente que aparecen en la literatura revelan que, además posee una mutación en el gen para malina, con lo cual es difícil intentar extraer conclusiones en este caso.

En referencia a la mutación C266S del dominio DSP, cabe destacar que ésta implica la mutación de la cisteína catalítica del dominio [14]. Esto se debe al cambio de esta cisteína por una serina, dos aminoácidos polares neutros pero en los cuales el cambio del grupo tiol implica la pérdida de la reactividad del dominio, fundamental para desempeñar su función. Por tanto, este es un mutante que carece de actividad fosfatasa, pero resulta interesante el hecho de que duplique la capacidad de interacción con malina y con R5/PTG con respecto a laforina silvestre. Sin embargo, solo conserva en un 27% su capacidad de homodimerización. Por tanto, esta mutación en el DSP también afecta a la formación del dímero y reduce considerablemente las opciones de que se forme. No obstante, la aparición del grupo hidroxilo de la serina parece traer consigo una estabilización muy fuerte de la unión entre laforina y los dos sustratos analizados, que supera con creces la que se da con laforina silvestre. Esto

sugiere que tal vez esta interacción tan fuerte recluta los sustratos y, al no desprenderse de ellos, el proceso se ve muy afectado, posiblemente impidiendo que laforina desempeñe tanto las funciones que implican interacción como aquellas que no la requieren, pues esta unión tan fuerte la mantiene “secuestrada”. Es importante mencionar que esta es la única mutación presentada en el trabajo no descrita en pacientes y que no existe de forma natural por el hecho de ser letal. No obstante, resultaba muy interesante conocer cómo afectaba a la interacción con los sustratos y a la homodimerización la mutación de la cisteína catalítica.

Por otra parte, la mutación G279S del dominio DSP, comprende un cambio de glicina a serina, un cambio que, al igual que sucede con el mutante G240S, no conlleva grandes cambios en cuanto a naturaleza físico-química. Este mutante pierde tanto la actividad fosfatasa como la capacidad de unirse a glucógeno [36]. La capacidad de interacción de este mutante se ve bastante reducida. En cuanto a su interacción con malina, conserva un 42% de actividad, y por lo que respecta a R5/PTG, conserva un 30%. Lo que se ve más reducido es su capacidad de homodimerización, que es del 20%. En este caso tampoco se dispone de datos sobre actividad fosfatasa o datos clínicos, pero sí que se aprecia, como en otros casos, una disminución de la capacidad de interacción con valores similares para los tres tipos de interacciones analizadas. Esto también llevaría a pensar en un efecto negativo sobre la estabilidad de la proteína, alterando su capacidad de interactuar.

La última mutación analizada fue Y294N, un cambio de tirosina a asparagina, dos aminoácidos polares neutros en los cuales el mutado carece de anillo aromático. En consecuencia, el mutante pierde por completo su capacidad de interacción con malina, con R5/PTG y consigo mismo. Esta mutación se localiza en la superficie entre los dominios CBD y DSP, y se ha descrito que el cambio no altera en exceso la estabilidad y plegamiento de la proteína y tampoco su unión al glucógeno, pero sí afecta a su actividad fosfatasa, disminuyéndola considerablemente [25]. Esto sugiere que la interacción entre ambos dominios es crítica para el desarrollo correcto de la función de laforina y que su alteración da lugar a la enfermedad de Lafora. Y, aunque en un principio no parezca desestabilizar considerablemente la proteína, sí es cierto que ésta pierde toda capacidad de interacción con los sustratos analizados y consigo misma, con lo cual la mutación podría alterar la superficie de interacción con los sustratos y estar provocando algún tipo de cambio alostérico en la superficie de dimerización.

Una visión general de los datos analizados hasta ahora pone de manifiesto que muchos de los mutantes analizados pierden la capacidad de interacción con los sustratos en mayor o menor medida, pero cada mutante ve reducida su capacidad de interacción con los dos sustratos en valores similares. Esto podría estar indicando que exista un único dominio de interacción con diversos sustratos, cuya desestabilización repercute de igual manera en la interacción con cada uno de ellos; o bien que no exista un único dominio, pero que los dos implicados en las interacciones analizadas estén muy cerca conformacionalmente y se vean afectados simultáneamente. En el análisis de la capacidad de formar dímeros, resulta más complejo extraer posibles explicaciones. Todos los mutantes pierden considerablemente la capacidad de homodimerizar, por lo que los puentes disulfuro y las interacciones débiles que sustentan el dímero parecen verse realmente alteradas al cambiar las propiedades químicas de algunos de los aminoácidos que integran la proteína.

Con los datos actuales, resulta complicado ligar cada mutación a una sintomatología y desarrollo de la enfermedad concretos. Al parecer, mutaciones muy

diversas en el gen de laforina dan lugar a manifestaciones clínicas muy similares, excepto en algunos casos como el del mutante N163D. Queda patente la necesidad de trabajar en profundidad la caracterización de cada mutación, para saber qué ocurre con la actividad fosfatasa y con las diversas interacciones llevadas a cabo y así intentar discernir cuál parece la vía afectada responsable en mayor medida de la etiología de la enfermedad. Los mutantes de este estudio dan cuadros clínicos muy similares, con lo cual el método seguido en este proyecto basado en el análisis de la interacción de laforina con sus sustratos y con ella misma, no parecen ser concluyentes para establecer relaciones directas entre la mutación y la sintomatología.

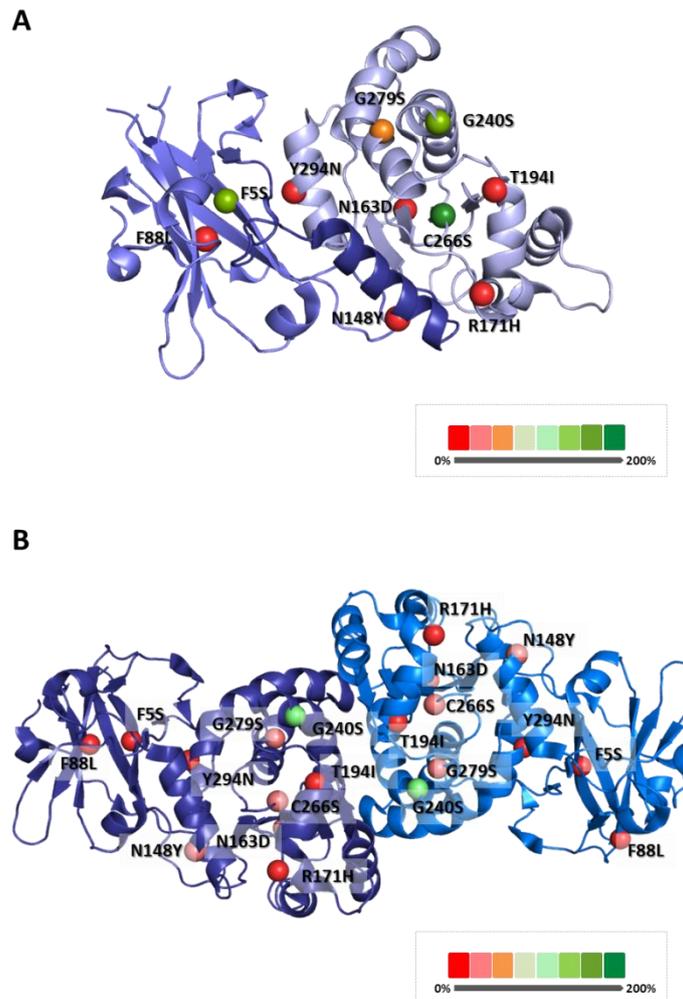


Figura 22. Estructura tridimensional de laforina humana que resume los resultados del proyecto. (A) Estructura tridimensional de laforina en su forma monomérica. Las esferas de colores señalan los carbonos α de las mutaciones con las que se ha trabajado en este proyecto. El código de colores es meramente orientativo y representa el porcentaje de actividad conservada en la interacción con los dos sustratos respecto al fenotipo silvestre **(B)** Estructura tridimensional de laforina humana en su forma homodimérica. Se representan en dos tonos de azul las dos moléculas antiparalelas que forman el dímero de laforina. Las esferas de colores representan los carbonos α de las mutaciones estudiadas en este proyecto y dan una idea global de cómo éstas se disponen en el homodímero. El código de colores es meramente orientativo y representa el porcentaje de actividad conservado en la homodimerización con respecto al fenotipo silvestre. Modelización de la estructura realizada con el programa PYMOL.

6. Conclusiones

En este proyecto han sido estudiadas un conjunto de mutaciones procedentes de pacientes de la enfermedad de Lafora (a excepción de la mutación C266S) y se ha caracterizado su perfil de interacción con malina, R5/PTG y consigo mismas, pudiendo llegar a las siguientes conclusiones:

1. La mayoría de los mutantes pierden en mayor o menor medida su capacidad de interacción con los sustratos malina y R5/PTG en valores muy similares, hecho que podría estar indicando que el dominio de interacción con ellos es único, o que ambos dominios se disponen de forma muy cercana espacialmente.
2. La variabilidad en los resultados de la homodimerización aporta complejidad al análisis y hace difícil su interpretación, dado que incluso mutaciones muy alejadas de la zona de interacción entre los monómeros provocan una pérdida total de la capacidad de interacción. Esto confirmaría la idea de que laforina es una proteína altamente inestable cuya estructura primaria debe permanecer inalterada para evitar cambios estructurales que alteren sus propiedades físico-químicas.
3. Con los datos actuales, resulta realmente complejo establecer una relación entre el perfil de interacción de cada mutante y la sintomatología del paciente de Lafora. Todavía no hay datos completos al respecto y esto dificulta considerablemente la asociación. Los mutantes que poseen datos clínicos publicados manifestaban una progresión similar de la enfermedad, una LD clásica, con lo cual no existen rasgos específicos que diferencien una mutación de otra y permitan establecer diferencias con las que fenotipar a los enfermos para un posterior estudio mejor clasificado.

7. Bibliografía

- [1] A. Shahwan, M. Farrell, and N. Delanty, "Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects," *Lancet Neurol.*, vol. 4, no. April, p. 239–48 ST–Progressive myoclonic epilepsies: a r, 2005.
- [2] B. A. Minassian, "Post-modern therapeutic approaches for progressive myoclonus epilepsy.," *Epileptic Disord.*, vol. 18, no. September, pp. 154–158, 2016.
- [3] S. Yokoi, J. Austin, F. Witmer, and M. Sakai, "Studies in Myoclonus Epilepsy (Lafora Body Form)," *Arch. Neurol.*, vol. 19, no. 1, p. 15, Jul. 1968.
- [4] M. Sakai, J. Austin, F. Witmer, and L. Trueb, "Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea.," *Neurology*, vol. 20, no. 2, pp. 160–76, Feb. 1970.
- [5] M. S. Gentry, C. Romá-Mateo, and P. Sanz, "Laforin, a protein with many faces: glucan phosphatase, adapter protein, et alii," *FEBS J.*, vol. 280, no. 2, pp. 525–537, Jan. 2013.
- [6] V. S. Tagliabracci *et al.*, "Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease," *Cell Metab.*, 2011.
- [7] F. Nitschke *et al.*, "Hyperphosphorylation of glucosyl c6 carbons and altered structure of glycogen in the neurodegenerative epilepsy lafora disease," *Cell Metab.*, 2013.
- [8] B. A. Minassian *et al.*, "Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy," *Nat. Genet.*, vol. 20, 1998.
- [9] J. M. Serratosa *et al.*, "A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2)," *Hum. Mol. Genet.*, 1999.
- [10] E. M. Chan *et al.*, "Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy," *Nat. Genet.*, 2003.
- [11] J. M. serratosa *et al.*, "The gene for progressive myoclonus epilepsy of the lafora type maps to chromosome 6q," *Hum. Mol. Genet.*, 1995.
- [12] C. Gómez-Abad *et al.*, "Lafora disease due to EPM2B mutations A clinical and genetic study."
- [13] B. A. Minassian *et al.*, "progressive myoclonus epilepsy Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy," *Neurology*, vol. 5555, 2000.
- [14] J. Wang, J. A. Stuckey, M. J. Wishart, and J. E. Dixon, "A unique carbohydrate binding domain targets the Lafora disease phosphatase to glycogen," *J. Biol. Chem.*, 2002.
- [15] S. Singh and S. Ganesh, "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*. 2009.
- [16] A. Cheng, M. Zhang, M. S. Gentry, C. A. Worby, J. E. Dixon, and A. R. Saltiel, "A

- role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease," *Genes Dev.*, 2007.
- [17] V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P. M. Coutinho, and B. Henrissat, "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, pp. D490–D495, Jan. 2014.
- [18] N. K. Tonks, "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006.
- [19] C. A. Worby, M. S. Gentry, and J. E. Dixon, "Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates," *J. Biol. Chem.*, 2006.
- [20] A. R. Sherwood, M. B. Johnson, A. V Delgado-Escueta, and M. S. Gentry, "A bioassay for Lafora disease and laforin glucan phosphatase activity.," *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 18, pp. 1869–76, Dec. 2013.
- [21] G. Ritte, M. Heydenreich, S. Mahlow, S. Haebel, O. Köttling, and M. Steup, "Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases," *FEBS Lett.*, 2006.
- [22] O. Kö, K. Pusch, A. Tiessen, P. Geigenberger, M. Steup, and G. Ritte, "Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase 1[w]."
- [23] L. Baunsgaard, H. Lütken, R. Mikkelsen, M. A. Glaring, T. T. Pham, and A. Blennow, "A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated α -glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis," *Plant J.*, 2005.
- [24] T. Niittylä *et al.*, "Similar protein phosphatases control starch metabolism in plants and glycogen metabolism in mammals," *J. Biol. Chem.*, 2006.
- [25] M. Raththagala *et al.*, "Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease," *Mol. Cell*, vol. 57, no. 2, pp. 261–272, Jan. 2015.
- [26] P. Sánchez-Martín *et al.*, "Dimerization of the Glucan Phosphatase Laforin Requires the Participation of Cysteine 329," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, 2013.
- [27] H. Lohi *et al.*, "Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy."
- [28] M. S. Gentry, C. A. Worby, and J. E. Dixon, "Insights into Lafora disease: Malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin," 2005.
- [29] M. B. Metzger, V. A. Hristova, and A. M. Weissman, "HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance," *J. Cell Sci.*, 2012.
- [30] Y. Ye and M. Rape, "Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 755–764, 2009.
- [31] R. J. Deshaies and C. A. P. Joazeiro, "RING Domain E3 Ubiquitin Ligases Key Words," 2009.
- [32] C. Romá-Mateo *et al.*, "Increased Oxidative Stress and Impaired Antioxidant Response in Lafora Disease," *Mol. Neurobiol.*, 2015.
- [33] S. Ganesh, R. Puri, S. Singh, S. Mittal, and D. Dubey, "Recent advances in the

- molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy," *J. Hum. Genet.*, vol. 51, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2006.
- [34] D. Vilchez *et al.*, "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy," *Nat. Neurosci.*, 2007.
- [35] C. A. Worby, M. S. Gentry, and J. E. Dixon, "Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG)," *J. Biol. Chem.*, 2008.
- [36] M. E. Fernández-Sánchez *et al.*, "Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation," *Hum. Mol. Genet.*, 2003.
- [37] S. Vernia, T. Rubio, M. Heredia, S. Rodríguez de Córdoba, and P. Sanz, "Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in Lafora disease models lacking the phosphatase laforin," *PLoS One*, 2009.
- [38] Y. Liu, Y. Wang, C. Wu, Y. Liu, and P. Zheng, "Deletions and missense mutations of EPM2A exacerbate unfolded protein response and apoptosis of neuronal cells induced by endoplasmic reticulum stress," *Hum. Mol. Genet.*, 2009.
- [39] C. M. Paumi *et al.*, "Mapping Protein-Protein Interactions for the Yeast ABC Transporter Ycf1p by Integrated Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid Analysis," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 1, pp. 15–25, Apr. 2007.
- [40] H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations," *J. Bacteriol.*, 1983.
- [41] E. A. Golemis, I. Serebriiskii, R. L. Finley, J. Gyuris, and R. Brent, "Interaction Trap/Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins (hunt by interaction mating), 2 Mikhail G. Kolonin (hunt by interaction mating)," *UNIT Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 2012011, no. 82.
- [42] S. Fields and O. Song, "A novel genetic system to detect protein-protein interactions," *Nature*, vol. 340, no. 6230, pp. 245–246, Jul. 1989.
- [43] X. Yang, E. Jane, A. Hubbard, and M. Carlson, "A Protein Kinase Substrate Identified by the Two-Hybrid System."
- [44] K. Ludin, R. Jiang, and M. Carlson, "Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 95, pp. 6245–6250, 1998.
- [45] H. Lohi *et al.*, "Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 18, pp. 2727–2736, Aug. 2005.
- [46] P. Cohen, A. Burchell, J. G. Foulkes, P. T. W. Cohen, T. C. Vanaman, and A. C. Nairn, "Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase," *FEBS Lett.*, vol. 92, no. 2, pp. 287–293, Aug. 1978.
- [47] M. J. Brady, A. C. Nairn, and A. R. Saltiel, "The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 47, pp. 29698–703, Nov. 1997.
- [48] S. Vernia *et al.*, "AMP-activated protein kinase phosphorylates R5/PTG, the glycogen targeting subunit of the R5/PTG-protein phosphatase 1 holoenzyme,

- and accelerates its down-regulation by the laforin-malin complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 13, pp. 8247–55, Mar. 2009.
- [49] M. C. Solaz-Fuster *et al.*, "Regulation of glycogen synthesis by the laforin - Malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway," *Hum. Mol. Genet.*, 2008.
- [50] S. Ganesh *et al.*, "The carbohydrate-binding domain of Lafora disease protein targets Lafora polyglucosan bodies," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 313, no. 4, pp. 1101–1109, Jan. 2004.
- [51] S. Ganesh *et al.*, "Genotype-phenotype correlations for EPM2A mutations in Lafora's progressive myoclonus epilepsy: exon 1 mutations associate with an early-onset cognitive deficit subphenotype," *Hum Mol Genet*, vol. 11, no. 11, pp. 1263–1271, 2002.
- [52] S. Singh, P. Satishchandra, S. K. Shankar, and S. Ganesh, "Lafora disease in the Indian population: EPM2A and NHLRC1 gene mutations and their impact on subcellular localization of laforin and malin.," *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 6, pp. E1–E12, Jun. 2008.
- [53] M. Garcia-Gimeno *et al.*, "Phenotypic characterization of a new EPM2A mutation (N163D)."
- [54] P. Gómez-Garre, Y. Sanz, S. R. Rodríguez De Córdoba, and J. M. Serratosa, "Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions.," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 8, no. 12, pp. 946–54, 2000.
- [55] D. Moreno, M. C. Towler, D. G. Hardie, E. Knecht, and P. Sanz, "The Laforin–Malin Complex, Involved in Lafora Disease, Promotes the Incorporation of K63-linked Ubiquitin Chains into AMP-activated Protein Kinase α Subunits," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, pp. 2578–2588, 2010.