

Caracterización funcional de un nuevo SNP asociado a la Discinesia Paroxística Cinesigénica Familiar

Trabajo Fin de Grado Biotecnología
Curso 2017/2018

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



Alumna: Laura Martínez Sotodosos

Tutores: Jacek Szymanski y Jordi Pérez Tur

Tutor académico: Fernando Cardona Serrate



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC



VALENCIA, SEPTIEMBRE 2018

ALUMNA: Laura Martínez Sotodosos

TUTORES: Jacek Szymanski, Jordi Pérez Tur y Fernando Cardona Serrate

FECHA: Valencia, Septiembre de 2018

TÍTULO: Caracterización funcional de un nuevo SNP asociado a la Discinesia Paroxística Cinesigénica Familiar.

RESUMEN:

La Discinesia Paroxística Cinesigénica Familiar (PKD, por sus siglas en inglés) es un trastorno neurológico de herencia autosómica dominante, caracterizado por episodios de movimiento anormal que van de leves a graves. Su aparición se suele dar en la infancia o la adolescencia, con un pico en la pubertad. Puede ser causada por mutaciones en el gen *PRRT2* (proteína transmembrana rica en prolina 2) del cromosoma 16p11. La proteína codificada por este gen está formada por un dominio citoplasmático, uno transmembrana y otro extracelular. Su función es desconocida, aunque se piensa que puede estar involucrada en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, interaccionando con proteínas que ayudan a controlar la liberación presináptica de neurotransmisores. Una señalización neuronal anormal causada por la proteína mutada podría provocar los problemas de movimiento asociados a la enfermedad.

Se realizó un estudio genético mediante secuenciación del exoma completo usando el secuenciador HiSeq 4000 (Illumina) en muestras de ADN de tres pacientes de PKD. Las variantes no sinónimas fueron verificadas por secuenciación Sanger y los cambios que parecieron *a priori* más interesantes fueron además examinados por PCR específica de alelo en una población control y todos los miembros de la familia (afectos y no afectados) disponibles.

Las variantes encontradas en *PRRT2* fueron seleccionadas como las más interesantes debido a que este gen ha sido asociado previamente con la PKD. La PCR específica de alelo mostró que el cambio estaba presente en el 100% de los miembros de la familia afectados por la enfermedad y en ninguno de los individuos sanos. Esta variante genética introduce un codón de parada, que podría causar una degradación del ARN mensajero (ARNm) mediada por una mutación terminadora, o bien una proteína truncada inestable o con su función alterada.

En este proyecto se abordará el estudio del efecto que la nueva mutación produce en la expresión o función de la proteína, para intentar explicar las causas de la enfermedad a nivel molecular. Para ello se utilizará una fusión de *PRRT2* con el epítipo Flag, amplificando *PRRT2* y sus variantes por PCR hasta las posiciones de la nueva mutación y dos previamente descritas que también introducen codones de parada para verificar si siguen el mismo mecanismo. Tras la subclonación y la verificación de los plásmidos por secuenciación de Sanger, se introducirán en células SH-SY5Y mediante transfección transitoria con lipofectamina. En las células transfectadas se analizarán los niveles de ARNm de las variantes (silvestre y mutadas) por PCR

cuantitativa, para determinar si el ARNm mutado se degrada por la ruta mediada por una mutación terminadora. Si los resultados muestran niveles normales de ARNm, se analizarán los niveles de proteína por *Western-blot*. En caso de no estar alterados los niveles de proteína, se realizará un experimento de pulso y caza con cicloheximida, parando el proceso de traducción y tomando muestras a diferentes tiempos para analizar la velocidad de degradación de las diferentes formas de la proteína. Esto nos permitiría comparar la estabilidad de la proteína silvestre con la de las mutadas, pudiendo así determinar si la causa de la enfermedad es la inestabilidad de las formas mutadas.

Por último, si los niveles de ARNm y proteína no están alterados en la nueva forma mutada de la proteína, se estudiará si está alterada su función. Para ello se comprobará si interacciona con proteínas con las que se ha descrito previamente que interacciona la forma silvestre (SNAP-25, Syt1 y Syt2), mediante co-inmunoprecipitación. También puede estudiarse si está alterada la correcta localización celular (membrana plasmática), mediante inmunocitoquímica y fraccionamiento celular utilizando anticuerpos contra el epítipo Flag (PRRT2) y contra proteínas marcadoras de membrana plasmática y de los diferentes orgánulos celulares.

PALABRAS CLAVE: Discinesia Paroxística Cinesigénica, PRRT2, mutaciones *nonsense*, estabilidad, interacciones.

STUDENT: Laura Martínez Sotodosos

PROFESSORS: Jacek Szymanski, Jordi Pérez Tur y Fernando Cardona Serrate

DATE: September 2018, Valencia

TITLE: Functional characterisation of a novel SNP associated with Familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia

SUMMARY

Familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) is an autosomal dominant neurologic disorder characterized by episodes of abnormal movement that range from mild to severe. Onset of the disorder usually coincides with childhood or early adulthood with a peak during puberty. PKD can be caused by mutations in the *PRRT2* (proline rich transmembrane protein 2) gene on chromosome 16p11. The protein expressed by this gene consists of a cytoplasmatic, a transmembrane and an extracellular domain. The function of the protein is unknown, although it is thought to be involved in development and functioning of the brain, interacting with proteins that help control signalling between neurons. *PRRT2* mutations

probably lead to abnormal neuronal signalling, and this altered neuronal activity could underlie the movement problems associated with familial PKD.

A genetic study was performed by whole exome sequencing using HiSeq 4000 sequencer (Illumina) with DNA samples of 3 patients with PKD. Nonsynonymous variants were verified by Sanger sequencing, and the most interesting genetic changes were examined by allele specific PCR in unaffected population control.

A new variant found in *PRRT2* was selected as the most interesting, as this gene was previously associated with PKD. Allele specific PCRs revealed that the variant was present in 100% of the family members affected by the disease and in none of the healthy individuals. This mutation introduces a stop codon, possibly causing a nonsense-mediated mRNA decay (NMD), an unstable truncated protein, or a protein functionally altered.

This project will study the effect that this novel variant has on the expression or function of the protein, in an effort to explain the disorder at molecular level. For this purpose, a fusion of *PRRT2* with Flag epitope was used, introducing the novel variant and two PKD-causing previously described mutations, which also introduce a stop codon, by PCR amplification. After subcloning and verification of the plasmids by Sanger sequencing, the plasmids were transiently lipofected in SH-SY5Y cell line. The mRNA levels in the variants (wild type and mutants) will be analyzed by quantitative PCR (qPCR), to determine whether the mutant mRNA is degraded by nonsense-mediated mRNA decay. If the qPCR shows no difference in mRNA levels, the protein levels will be assessed by Western blot. In case the protein levels are not being altered, a pulse-chase experiment with cycloheximide will be performed, stopping translation and collecting samples at different times to analyse degradation rate of different forms of the protein. This will allow to compare the stability between the wild type and mutant proteins, to further determine whether the cause of the disorder lies in the instability of the mutated forms.

Finally, if the levels of mRNA and the protein are not altered in the mutant protein, its function will be examined. Co-Immunoprecipitation will be used to verify whether it interacts with proteins previously described as interacting with the wild type form (SNAP-25, Syt1 y Syt2). In addition, a study of the correct cellular localisation (plasma membrane) can be performed by immunocytochemistry and cell fractionation using antibodies against Flag epitope (*PRRT2*) and against plasma membrane and different organelles marker proteins.

KEYWORDS: paroxysmal kinesigenic dyskinesia, *PRRT2*, *nonsense* mutations, stability, interactions.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, muchas gracias a Jordi por dejarme formar parte del equipo de la UGM y ayudarme con todo cuando ha sido necesario. Gracias también a Fernando por tener siempre la respuesta a mis muchas preguntas, la paciencia para enseñarme cómo hacer bien las cosas y por estar siempre disponible cuando he tenido algún problema. Y en especial a Jacek por estar siempre ahí, ayudarme en todo y ser la persona a la que recurrir a la más mínima duda. Ha sido un placer conocer a las personas que han pasado por aquí en este tiempo, y que han hecho los días de laboratorio más llevaderos.

Este trabajo tampoco habría sido posible sin el apoyo de mi familia y mis amigos de los que siempre he recibido palabras de ánimo y me han empujado hacia delante en todos estos años y sin los que no habría podido llegar hasta aquí.

Y por último gracias a mis compañeros de Biotecnología, que rápidamente se convirtieron en amigos, con los que he compartido innumerables momentos que siempre se volvían mejores gracias a ellos y sin los que no podría imaginarme ahora mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. La discinesia paroxística cinesigénica..... | 1 |
| 1.2. PRRT2..... | 6 |
| 1.2.1. El gen <i>PRRT2</i>. Estructura y mutaciones en la discinesia paroxística cinesigénica.. | 6 |
| 1.2.2. La proteína PRRT2. Dominios funcionales, interacción con complejos proteicos y papel en la discinesia paroxística cinesigénica..... | 8 |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS..... | 14 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1. Material Biológico..... | 15 |
| 3.1.1. Plásmidos utilizados..... | 15 |
| 3.1.2. Oligonucleótidos..... | 17 |
| 3.1.3. Cepa bacteriana..... | 19 |
| 3.1.4. Línea celular..... | 19 |
| 3.2. Métodos de cultivo bacteriano..... | 19 |
| 3.3. Métodos de extracción, manipulación y análisis de ADN..... | 20 |
| 3.3.1. Obtención de plásmidos (minipreps y midipreps)..... | 20 |
| 3.3.2. Clonación..... | 20 |
| 3.3.2.1. Amplificación por PCR..... | 20 |
| 3.3.2.2. Digestión y extracción de gel..... | 21 |
| 3.3.2.3. Desfosforilación y ligación..... | 21 |
| 3.3.2.4. Transformación de células electrocompetentes..... | 21 |
| 3.4. Métodos de cultivos de líneas celulares humanas..... | 22 |
| 3.4.1. Mantenimiento y tripsinización..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.2. Transfección..... | 23 |
| 3.5. Métodos de extracción, manipulación y análisis de ARN..... | 23 |
| 3.5.1. Extracción de ARN..... | 23 |
| 3.5.2. Cuantificación ARN..... | 24 |
| 3.5.3. Tratamiento con DNasas y síntesis de ADNc..... | 24 |
| 3.5.4. qPCR..... | 24 |
| 3.6. Métodos de extracción, manipulación y análisis de proteínas..... | 25 |
| 3.6.1. Extracción de proteínas..... | 25 |
| 3.6.2. Cuantificación de proteínas..... | 25 |
| 3.6.2.1. Cuantificación fluorométrica con Qubit..... | 25 |
| 3.6.2.2. Cuantificación por método Bradford..... | 25 |
| 3.6.3. Western blot..... | 26 |
| 3.6.4. Co-inmunoprecipitación..... | 26 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 28 |
| 4.1. Expresión de las variantes de <i>PRRT2</i> con y sin NMDi mediante qPCR.... | 28 |
| 4.2. Expresión de las variantes de <i>PRRT2</i> con y sin NMDi mediante Western blot..... | 33 |
| 4.3. Interacción de las variantes de <i>PRRT2</i> con SNAP-25, Syt1 y Syt2..... | 34 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 36 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |
| 7. ANEXO I..... | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|---|
| Tabla 1.1. Adaptación de Schelosky, 2010. Resumen de las discinesias paroxísticas (de acuerdo con la clasificación de Jankovic y Derirkiran, 2002)..... | 3 |
| Tabla 1.2. Clasificación de las discinesias paroxísticas según el Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano. Adaptado de McGuire, Chanchani, & Khurana, 2018..... | 4 |

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Tabla 3.1. Plásmidos utilizados..... | 15 |
| Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en el proyecto..... | 18 |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| Tabla 4.1 Concentración de ADNc medida con Nanodrop..... | 29 |
|--|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Patrón de movimiento de dos pacientes con discinesia paroxística cinesigénica..... | 2 |
| Figura 1.2. Mapa genético de las discinesias paroxísticas en el cromosoma 16..... | 6 |
| Figura 1.3. Estructura del gen (arriba) y la proteína (abajo) PRRT2..... | 7 |
| Figura 1.4. Topología de PRRT2 en la membrana..... | 9 |
| Figura 1.5. Representación esquemática de la ruta de señalización del glutamato y su alteración por PRRT2 mutante..... | 10 |
| Figura 1.6. Representación esquemática del papel de la proteína PRRT2 en la sinapsis y su interacción con el SNARE..... | 11 |
| Figura 1.7. Mutaciones mapeadas en la proteína PRRT2..... | 12 |
| Figura 1.8. Detección de la localización de la proteína PRRT2 mutante in vitro con microscopía confocal..... | 13 |

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1. Vectores utilizados en el proceso de clonación..... | 16 |
| Figura 3.2. Vectores de expresión utilizados en el proceso de co-inmunoprecipitación..... | 17 |
| Figura 3.3. Vista de las células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266TM) al microscopio..... | 19 |
| Figura 3.4. Representación esquemática del proceso de co-inmunoprecipitación..... | 27 |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|---|----|
| Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ARN..... | 28 |
| Figura 4.2. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando GADPH..... | 29 |
| Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando Flag..... | 30 |
| Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando PRRT2..... | 31 |
| Figura 4.5. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando GADPH..... | 31 |
| Figura 4.6. Comparación de la expresión entre las muestras y PRRT2 silvestre..... | 32 |
| Figura 4.7. Comparación de la expresión entre muestras sin NMDi y con NMDi..... | 32 |
| Figura 4.8. Resultados de Western blot..... | 33 |
| Figura 4.9. Resultados de co-inmunoprecipitación de la proteína SNAP-25 en muestras de las variantes (A) Q106X (B) Q250X (C) 163X y (D) WT..... | 35 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ADN-FLE | Epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante (del inglés, <i>autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy</i>) |
| AMPA | <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> |
| BFIE | Epilepsia infantil familiar benigna (del inglés, <i>benign familial infantile epilepsy</i>) |
| DCt | <i>delta cycle threshold</i> |
| DPC | Discinesia paroxística cinesigénica |
| DSPs | Dispaninas |
| DYT | Distonías |
| EEG | Electroencefalograma |
| EKD1 | <i>Episodic kinesigenic dyskinesias 1</i> |
| EKD2 | <i>Episodic kinesigenic dyskinesias 2</i> |
| EKD3 | <i>Episodic kinesigenic dyskinesias 3</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| HGNC | Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano (del inglés, <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>) |
| IBV-CSIC | Instituto de Biomedicina de Valencia- Centro Superior de Investigaciones Científicas |
| IC | Convulsiones infantiles (del inglés, <i>infantile convulsion</i>)s |
| ICCA | Convulsiones infantiles y coreoatetosis (del inglés, <i>Infantile convulsions and choreoathetosis</i>) |
| iPSC | Células madre pluripotentes inducidas (del inglés <i>induced pluripotent stem cells</i>) |
| NMD | <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> |
| o/n | <i>overnight</i> |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>) |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés <i>quantitative polymerase chain reaction</i>) |

| | |
|------------------|--|
| PD | Discinesias paroxísticas (del inglés, <i>paroxystical dyskinesias</i>) |
| PED | Discinesia paroxística inducida por ejercicio (del inglés <i>paroxystical exercise-induced dyskinesia</i>) |
| PHD | Discinesia paroxística hipnogénica (del inglés, <i>paroxystical hypnogenic dyskinesia</i>) |
| PNKD | Discinesia paroxística no cinesigénica (del inglés, <i>paroxystical non-kinesigenic dyskinesia</i>) |
| PKC | Coreoatetosis paroxística cinesigénica (del inglés, <i>paroxystical kinesigenic choreoathetosis</i>) |
| PKD | Discinesia paroxística cinesigénica (del inglés, <i>paroxystical kinesigenic dyskinesia</i>) |
| PRD | Dominio rico en prolina (del inglés, <i>proline rich domain</i>) |
| PRRT2 | Proteína transmembrana rica en prolina 2 |
| RE-PED-WC | Epilepsia rolándica recesiva con distonía paroxística inducida por el ejercicio y calambre del escritor (del inglés, <i>autosomal recessive rolandic epilepsy with paroxysmal exercise-induced dystonia and writer's cramp</i>) |
| shRNA | short-hairpin RNA |
| Syt | Sinaptotagmina (del inglés, <i>synaptotagmine</i>) |
| SNARE | Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (del inglés, <i>soluble NSF attachment protein receptor</i>) |
| SNAP-25 | Proteína de 25 KDa asociada al sinaptosoma (del inglés, <i>synaptosomal-associated protein 25</i>) |
| SV | Vesícula sináptica (del inglés, <i>synaptical vesicle</i>) |
| TM | Transmembrana |
| Tm | Temperature of melting |
| UGM | Unidad de genética molecular |
| VAMP2 | Proteína 2 de membrana asociada a vesícula (del inglés, <i>vesicle-associated membrane protein</i>) |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La discinesia paroxística cinesigénica

La Discinesia paroxística cinesigénica (abreviado como DPC; PKD por sus siglas en inglés) es un trastorno neurológico hereditario del movimiento, caracterizado por recurrentes y breves (normalmente de menos de 5 minutos) ataques de movimientos anormales involuntarios, que son frecuentemente inducidos por movimientos voluntarios repentinos o por sobresaltos (Tomita et al., 1999)

Está clasificada dentro del grupo de trastornos paroxísticos¹ del movimiento (Fejerman & Fernández, 2007), caracterizados por movimientos distónicos², coreicos³, atetósicos⁴ o balísticos⁵ (Blakeley & Jankovic, 2002). Es común la diferente combinación de estos movimientos, que pueden afectar, por ejemplo, al brazo o la pierna en una o ambas partes del cuerpo (unilateral o bilateral), o a todas las extremidades. La cabeza y el tronco están involucrados con menor frecuencia, pero se han descrito caídas y disartria⁶. Las partes y el lado del cuerpo involucrados pueden variar entre los ataques. La consciencia nunca se pierde, y los movimientos involuntarios rara vez son dolorosos. Se puede ver un ejemplo del patrón de movimiento en la figura 1.1. El grado de movimiento discinésico es variable entre las familias y dentro de los miembros de las propias familias descritas, yendo desde movimientos leves que permiten continuar la actividad diaria a bruscos movimientos completamente incapacitantes. El paciente a menudo se familiariza con un curso típico de su ataque, aunque puede haber variabilidad. Se puede dar una anticipación similar a la del aura, en forma de hormigueo, sensación de rigidez o temblores en las extremidades afectadas, que ocurre en más del 80% de los pacientes. Suspender o ralentizar el movimiento previsto durante la sensación premonitoria puede evitar o mitigar el ataque (Schelosky, 2010).

Fue descrita como “coreoateotisis paroxística cinesigénica” (PKC) por Kerstesz en 1967 (Kertesz, 1967; Sadamatsu et al., 1999), quien añadió el término “cinesigénica” al título de “coreoateosis paroxística” establecido anteriormente por otros autores como Mount y Reback en

¹ Se denomina paroxística cuando la aparición de los ataques se da de forma brusca

² La distonía es un trastorno del movimiento que causa contracciones involuntarias de los músculos, que resultan en torsiones y movimientos repetitivos. Algunas veces son dolorosas.

³ La corea engloba aquellos movimientos irregulares, no predecibles y de duración breve, que cambian de una zona corporal a otra sin secuencia definida

⁴ Los movimientos atetósicos se caracterizan por ser continuos, lentos, repetitivos y extravagantes, afectando a los dedos, manos y cara.

⁵ El balismo es una variedad de corea con predominio de movimientos proximales amplios.

⁶ La disartria es la dificultad para articular sonidos y palabras causada por una parálisis o una ataxia de los centros nerviosos que rigen los órganos fonatorios.

INTRODUCCIÓN

1940 (Mount & Reback, 1940) o Stevens en 1966 y Lance en 1977 tras hacer una revisión de los casos estudiados hasta la fecha y los suyos propios. Este término caracterizaba aquellos casos cuyos ataques eran inducidos por movimientos repentinos a diferencia de los observados por otros autores (Loong & Ong, 1973), y eran de corta duración. Cubría casos descritos hasta entonces como “coreoatetosis paroxística familiar”, “coreoatetosis”, “coreoatetosis paroxística”, “disonía paroxística”, “epilepsia refleja” o “convulsiones inducidas por movimiento” entre otras (Lance, 1977).

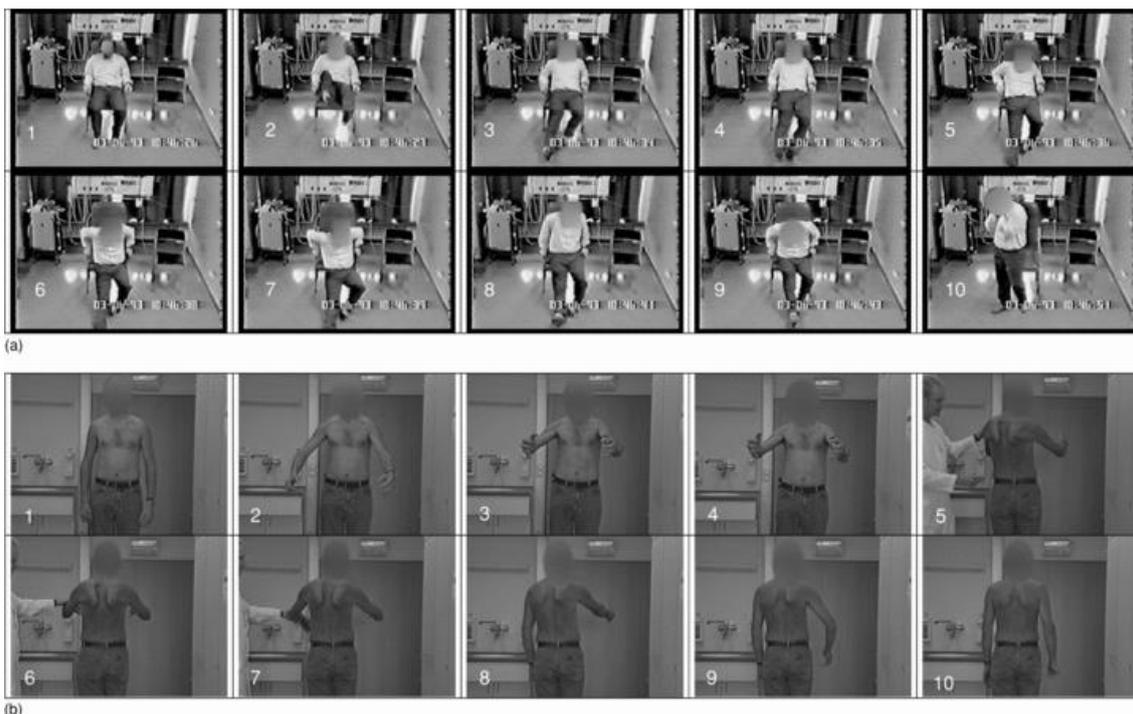


Figura 1.1. Patrón de movimiento de dos pacientes con discinesia paroxística cinesigénica. (a) El paciente está sentado en la silla (1) y mueve ambas piernas voluntariamente (2). Segundos después la pierna derecha se extiende distónicamente, el tronco se estira y saca al paciente de la silla (3-7). El paciente se empuja voluntariamente hacia arriba con los brazos (8,9). El ataque pasa tras 17 segundos y puede levantarse (10). (b) El paciente levanta ambos brazos voluntariamente (1-2). Los músculos se contraen distónicamente (3-4), estando los músculos de las escápulas involucrados (5-6). Tras 38 segundos se pasa en el brazo izquierdo (7-8) y 6 segundos después también en el derecho (9-10). (Schelosky, 2010).

Se prefirió usar el nombre de “discinesias” para referirse a estas enfermedades en lugar de distonías, coreas o coreoatetosis, ya que es un término más genérico que engloba mejor todos los desórdenes del movimiento observados en cada paciente. Dentro de las discinesias paroxísticas (PD), se estableció la clasificación de los ataques en cuatro categorías principales de acuerdo a las circunstancias que precedían los ataques, dividiéndose en PKD, discinesia paroxística no cinesigénica (PNKD), discinesia paroxística inducida por ejercicio (PED) y discinesia paroxística hipnogénica (PHD) en la que los episodios de movimientos involuntarios ocurrían solo durante el sueño, a la vez todos ellos divididos por la duración de dichos ataques

(menos o más de 5 minutos) y su presunta etiología (idiopática: familiar o esporádica y secundaria: causada por otra condición médica subyacente) (Demirkiran & Jankovic, 1995). En la tabla 1.1 se puede observar un resumen de estas y sus principales características.

En algunos pacientes o en sus familiares de primer y segundo grado, la PKD frecuentemente se combina con otras enfermedades genéticas neurológicas intermitentes, como convulsiones infantiles (IC) o convulsiones infantiles y coreoatetosis (ICCA) (Tomita et al., 1999). Éstas podrían ser enfermedades alélicas ya que como se verá más adelante, los genes causantes de las mismas mapean regiones cercanas (Figura 1.2) (Ono et al., 2012).

Tabla 1.1. Adaptación de Schelosky, 2010. Resumen de las discinesias paroxísticas (de acuerdo con la clasificación de Jankovic y Derirkiran, 2002).

| | Discinesia paroxística cinesigénica (PKD) | Discinesia paroxística no cinesigénica (PNKD) | Discinesia paroxística inducida por ejercicio (PED) | Discinesia paroxística hipnogénica (PHD) |
|------------------------------------|--|--|--|---|
| Causa | Movimiento repentino | Alcohol, café, té, espontáneo | Ejercicio de larga duración | Fase II de sueño no-REM |
| Duración | De segundos a pocos minutos | De minutos a días | 5-30 minutos | Mayormente de 30-45 segundos |
| Patrón de movimiento típico | Distónico, coreico, balístico | Distónico | Distónico | Distónico, coreico, balístico |
| Frecuencia | Muchos al día | De pocos al día a algunos por año | De 1 al día a 2 al mes | De 1-20 por noche a 5 al año |
| Edad de aparición | 7-14 años | Antes que la PKD | 9-15 años | 3-47 años, con una media de 21,8 años |
| Ratio de género | Hombres>>Mujeres | Hombres>Mujeres | Hombres>Mujeres | Hombres=Mujeres |
| Tratamiento | Fármacos antiepilépticos | Evitar los desencadenantes | Evitar ejercicio de larga duración | Fármacos antiepilépticos |

La PHD, originalmente clasificada como PD, ahora es considerada como una forma de epilepsia, denominada epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante (ADN-FLE) (McGuire et al., 2018).

INTRODUCCIÓN

El Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano (HGNC por sus siglas en inglés) estableció una clasificación de los genes basada en un sistema de codificación en el que el nombre establecido en el caso de genes asociados a distonías fue DYTn donde “n” era la etiqueta asignada al *loci* del gen que puede vincularse con un fenotipo específico y marcadores genéticos asociados. Esta clasificación genética es menos utilizada debido a muchos defectos, incluyendo la presencia de *loci* no confirmados, irreproducibles, faltantes, duplicados, discordancia entre fenotipos y los criterios establecidos por este comité, entre otros. (McGuire et al., 2018). Un ejemplo de esta clasificación se muestra en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Clasificación de las discinesias paroxísticas según el Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano. Adaptado de McGuire et al., 2018.

| DYTn | Nombre clínico | Locus del gen | Gen |
|-------|---|---------------|----------------|
| DYT8 | Discinesia Paroxística no cinesigénica 1 | 2q | MR-1 |
| DYT20 | Discinesia paroxística no cinesigénica 2 | 2q | - |
| DYT10 | Discinesia paroxística cinesigénica 1 | 16pq | PRRT2 |
| DYT19 | Discinesia paroxística cinesigénica 2 | 16q | - |
| DYT18 | Discinesia Paroxística Inducida por Ejercicio | 1p | SLC2A1 o GLUT1 |

La prevalencia de estos trastornos es desconocida, pero son poco frecuentes, representando el 0,8% de los casos en una unidad especializada en trastornos del movimiento. La PKD es la más común de estas discinesias paroxísticas, se estima una prevalencia de 1:150000 (Bruno & Hallett, 2011; Palau-bargues et al., 2010; Spacey & Adams, 1993).

Aunque los síntomas pueden comenzar entre 1 y 57 años de edad, es más frecuente entre 6 y 16 años, habitualmente en la pubertad. La frecuencia y severidad de los ataques generalmente disminuye con la edad. El 90% tiene su primer ataque antes de los 15 años, y es poco probable que se dé una PKD idiopática después de los 20 años. Existen casos donde el trastorno se manifiesta durante el primer año de vida, denominándose PKD de inicio infantil (Schelosky, 2010; Tomita et al., 1999).

Alrededor de la mitad de los afectados tienen un historial familiar con este trastorno, que se ha descrito como hereditario con un patrón autosómico dominante (Demirkiran & Jankovic, 1995; Goodenough, 1978; Marsden, 1996). Para los tipos idiopáticos y familiares predomina en hombres en una *ratio* que va desde 4:1 a 8:1. Los casos secundarios parecen tener más diversidad y pueden presentarse a diferentes edades. La etiología subyacente más común para

estos casos secundarios comprende principalmente esclerosis múltiple, insuficiencia vascular cerebral, trastornos metabólicos (alteraciones de la glucemia e hipocalcemia), o trauma previo entre otros, listados en la tabla 7.1 del anexo I (Bennett et al., 2000; Blakeley & Jankovic, 2002; Bruno & Hallett, 2011; Schelosky, 2010).

Los ataques son desencadenados por un movimiento repentino tras un período de descanso, por ejemplo, después de que el paciente haya estado sentado por algún tiempo o al cambiar la velocidad al andar. La ansiedad reduce el umbral de ataque en dos tercios de los pacientes. Existen algunos agentes que en raras ocasiones actúan como precipitantes, como la cafeína, la inanición, el cannabis, la menstruación y el clima frío (Schelosky, 2010). Durante los mismos puede que los pacientes no sean capaces de hablar si la cara o la mandíbula están involucradas en el ataque, pero no se observa alteración de la consciencia. Los electroencefalogramas (EEG) y los estudios de imagen del cerebro son usualmente normales (McGuire et al., 2018). Los ataques son breves, durando sólo segundos, aunque en muy pocas ocasiones pueden llegar a durar hasta varias horas. Pueden ser muy frecuentes, ocurriendo de 100 veces al día, o menos frecuentes, desencadenándose una vez al mes (Demirkiran & Jankovic, 1995). Se ha informado de algunos casos en los que se da un aura sensorial antes de los ataques, consistente en parestesia, rigidez o sensación de tensión (Marsden, 1996).

En cuanto al tratamiento se han visto muy buenas respuestas a bajas dosis de fármacos anticonvulsionantes, particularmente bloqueadores de canales de sodio. Hay hasta un 90% de *ratio* de respuesta con carbamazepina y fenitoína (Sun et al., 2012). Existen informes de casos no controlados de respuestas positivas a fenobarbital, levetiracetam, oxcarbazepina y topiramato. También se ha tenido éxito terapéutico con acetazolamida, levodopa, tetrabenazina y flunarizina. En general, en la población adulta, el 77% de los pacientes pierde sus síntomas, mientras que el 14% experimenta una reducción de los ataques de más del 50% (Nagamitsu et al., 1999; Schelosky, 2010), siendo la *ratio* de remisión mayor en mujeres que en hombres (McGuire et al., 2018). Los casos infantiles son más variables en respuesta a los fármacos antiepilépticos. (Schelosky, 2010)

1.2. PRRT2

1.2.1. El gen PRRT2. Estructura y mutaciones en la discinesia paroxística cinesigénica

En 1999 Tomita *et al.* realizó un análisis de ligamiento y de haplotipos a lo largo de todo el genoma en ocho familias japonesas, ligando la enfermedad a una región entre *D16S3093* y *D16S416*, que comprende 12,4cM de la región cromosómica 16p11.2–q12.1 (figura 1.2), denominándola EKD1 (de *episodic kinesigenic dyskinesias 1*) (Tomita et al., 1999). Posteriormente, numerosos estudios en varias etnias confirmaron este ligamiento en la región pericentromérica del cromosoma 16, acotando el ligamiento entre los diferentes estudios a la zona entre *D16S3093* y *D16S3396* (Bennett et al., 2000; Wang et al., 2010). Otras dos regiones no solapantes con EKD1 fueron identificadas y definidas como EKD2 (16q13–q22.1) y EKD3 (3q28-29), en la cual se encuentran varios genes involucrados en el desarrollo cerebral y la regulación de canales de sodio (Liu et al., 2016).

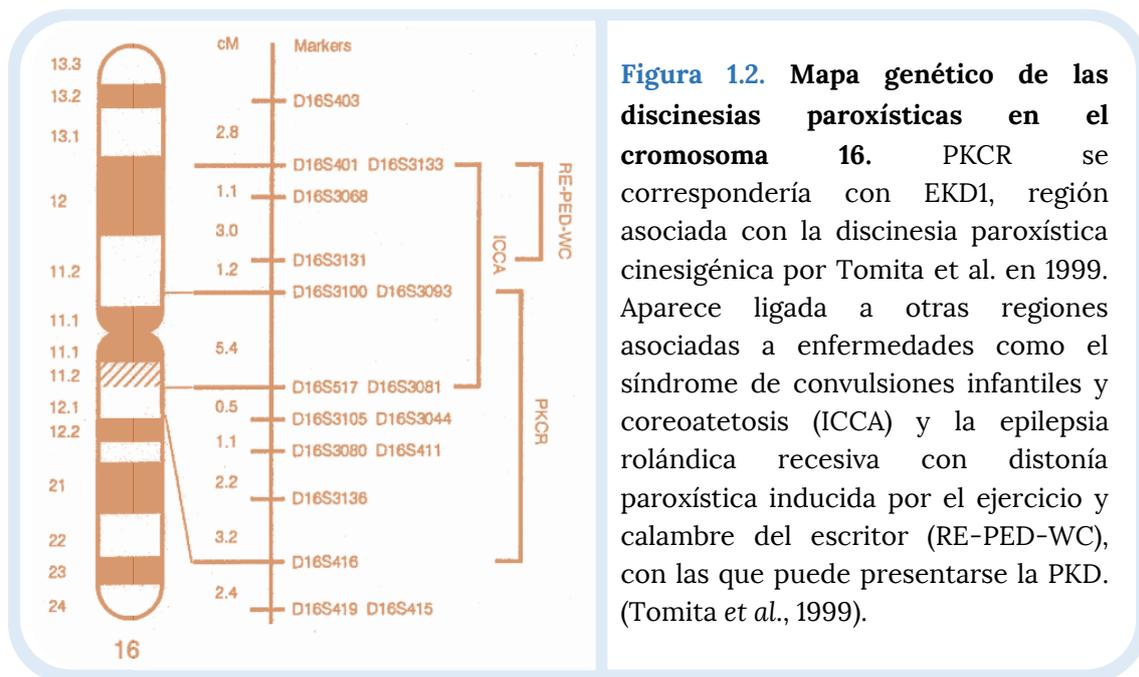


Figura 1.2. Mapa genético de las discinesias paroxísticas en el cromosoma 16. PKCR se correspondería con EKD1, región asociada con la discinesia paroxística cinesigénica por Tomita et al. en 1999. Aparece ligada a otras regiones asociadas a enfermedades como el síndrome de convulsiones infantiles y coreoatetosis (ICCA) y la epilepsia rolándica recesiva con distonía paroxística inducida por el ejercicio y calambre del escritor (RE-PED-WC), con las que puede presentarse la PKD. (Tomita et al., 1999).

En 2011, tras la secuenciación del exoma completo de las muestras de ADN obtenidas de tres miembros afectados en dos familias diferentes, Wang *et al.* descubrieron que el único gen con mutaciones en los tres pacientes era *PRRT2*. Las mutaciones incluían una mutación por inserción (p.P217fs) en la familia A y una mutación sin sentido (p.Q163X) en la familia B. Después distintas mutaciones fueron encontradas en el mismo gen, y a pesar de ser en *PRRT2* las características clínicas de la enfermedad variaban entre familias. Por lo que concluyeron que era posible que otras mutaciones no apreciadas en un gen diferente pudieran contribuir a la

heterogeneidad de los fenotipos de la PKD (Wang et al., 2011). Otros estudios avalaron este hallazgo, señalando a *PRRT2* como causante de la enfermedad y añadiendo variantes patogénicas (Chen et al., 2011; Hederá et al., 2012; Méneret et al., 2012; Prabhakara & Anbazhagan, 2014).

El gen *PRRT2* está compuesto por cuatro exones, el primero de ellos no codificante. Está localizado en el cromosoma 16 (16p11.2–q12.1 y 16q13–q22.1), su longitud es de 3833bp y codifica la proteína transmembrana rica en prolina 2 (PRRT2). Su estructura está representada en la figura 1.3.

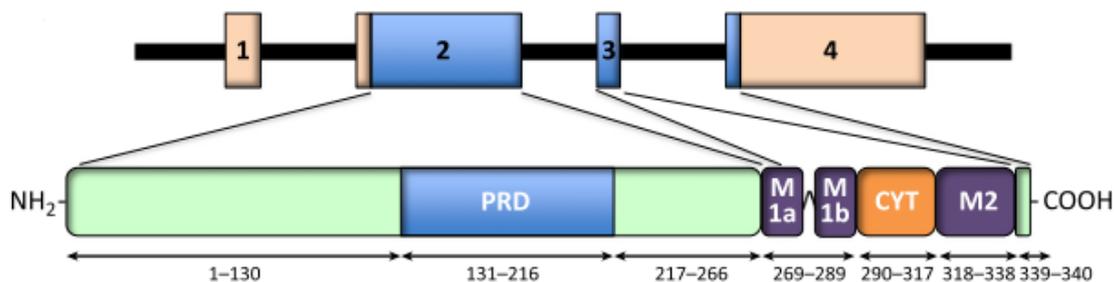


Figura 1.3. Estructura del gen (arriba) y la proteína (abajo) PRRT2. PRRT2 contiene cuatro exones, codificando una proteína multidominio de 340 aminoácidos formada por un dominio N-terminal largo (aminoácidos 1-268) que contiene una región rica en prolina (PRD); dos supuestas hélices transmembrana, M1 (269-289) y M2 (318-338), separadas por un bucle intracelular (CYT, 290-317), y un dipéptido C-terminal (339-340). A pesar de su similitud con las proteínas de la familia de las Dispaninas, sólo M2 es un auténtico dominio transmembrana, mientras que M1 está doblado en dos mitades (M1a y M1b) por un asa formada por dos residuos de prolina y como consecuencia M1 no cruza la membrana (Valtorta et al., 2016).

Además, se observaron mutaciones en este gen en pacientes con ICCA y epilepsia infantil familiar benigna (BFIE) y más recientemente, en pacientes con PED o PNKD. Todos estos hallazgos ampliaron el espectro de fenotipos causados por mutaciones en *PRRT2* (Heron & Dibbens, 2013; Wu et al., 2014). Las mutaciones en *PRRT2* se han descrito en más de 330 familias de diferentes grupos étnicos con PKD, BFIE y ICCA y se han identificado más de 50 mutaciones, la mayoría de ellas de codón de parada, de cambio en la pauta de lectura y alteración de sitio de *splicing*, dando lugar a formas truncadas de la proteína (Heron & Dibbens, 2013; Li et al., 2016).

En cuanto a la conservación del gen en otras especies, se han encontrado ortólogos de *PRRT2* en humano, gorila, macaco, ratón, cobaya, perro, gato, delfín y pez cebra, pero no en mosca y nematodo. Se observó que la secuencia C-terminal de *PRRT2*, donde se dan muchas de las mutaciones, estaba extremadamente conservada entre especies, lo que sugiere un papel importante de esta región de la proteína en su función biológica (Lee et al., 2012).

INTRODUCCIÓN

La presentación clínica de la PKD varía entre los pacientes con mutación en el gen *PRRT2* y los que no la tienen. Los pacientes con mutaciones desarrollan la enfermedad a una edad más temprana, presentan ataques bilaterales en el 100% de los casos estudiados frente al 42% de los pacientes sin mutación en el gen. Además, los pacientes con mutación presentan ataques de mayor duración. En cuanto al tratamiento farmacológico, se vio una mayor respuesta a carbamazepina (50mg/d) en casos con mutación en *PRRT2* en comparación a los que no (Li et al., 2013).

1.2.2. La proteína PRRT2. Dominios funcionales, interacción con complejos proteicos y papel en la discinesia paroxística cinesigénica

PRRT2 consta de 340 aminoácidos, y por su estructura fue clasificada dentro de la gran familia de Dispaninas (DSPs), cuyos miembros comparten la topología de tener dos dominios transmembrana (Rossi et al., 2016).

La supuesta topología de las DSPs consiste en dos hélices transmembrana en la región C-terminal, separadas por un bucle de longitud variable y una región N-terminal frecuentemente larga (>100 aminoácidos) en comparación con la región C-terminal (<10 aminoácidos), ambas orientadas hacia el exterior de la célula (Rossi et al., 2016).

Un análisis detallado de la estructura primaria de la proteína humana identificó las dos hélices transmembrana (TM) predichas en la región C-terminal de la proteína (TM1, aminoácidos 269-289 y TM2, aminoácidos 318-338), una región N-terminal larga y relativamente desestructurada (aminoácidos 1-268), incluyendo un dominio rico en prolina (aminoácidos 133-222), un bucle intracelular polar (aminoácidos 290-317) conectando las dos hélices transmembrana y una región muy corta C-terminal (Chen et al., 2011). El ortólogo en ratón es aparentemente idéntico a la proteína humana en el C-terminal con algunas diferencias en la región N-terminal (Lee et al., 2012).

Más tarde, se encontró que la topología de PRRT2 no era exactamente la esperada para otras DSPs. Mediante experimentos de inmunomarcaje en vivo, microscopía electrónica (inmuno-oro), biotinización de superficie y modelado computacional, se demostró que el largo dominio N-terminal no estaba orientado al espacio extracelular, si no que se encontraba en el citosol y solo el dominio corto C-terminal era extracelular (orientación N_{cit}/C_{exo}). Esta topología se ajusta a la de las proteínas transmembrana de tipo II con un anclaje C-terminal muy corto y lleva a la conclusión de que solo la segunda región hidrofóbica C-terminal abarca la membrana plasmática, mientras que la primera se asocia con la superficie interna de la membrana sin cruzarla (figuras 1.3 y 1.4) (Rossi et al., 2016).

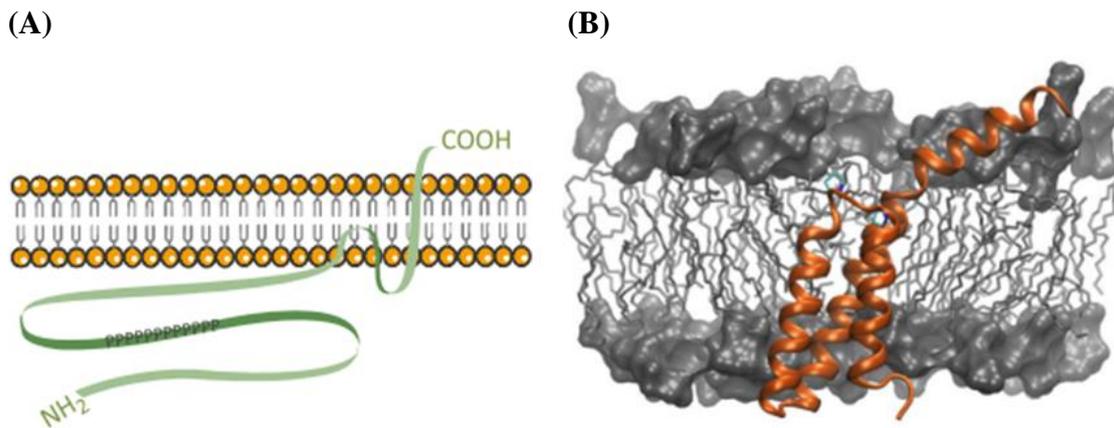


Figura 1.4. Topología de PRRT2 en la membrana. (A) Debido a su dominio transmembrana único, PRRT2 expone el dominio N-terminal largo y el bucle corto M1-M2 al citoplasma y mantiene un anclaje C-terminal, siguiendo el modelo de una proteína transmembrana tipo II. (B) Modelo del sistema de membrana con la región de PRRT2 que abarca las hélices M1 y M2 (residuos 261-340) predicha por simulaciones de dinámica molecular. Mientras que M2 es un verdadero dominio transmembrana, M1 es un motivo hélice-bucle-hélice (M1a / M1b) en el que la bisagra se da en la proximidad de dos residuos de prolina (Pro^{279,282}). La cadena principal de la proteína (excluyendo la región N-terminal) se muestra de forma esquemática, con los dos residuos de prolina representados en verde (Valtorta et al., 2016).

Esta estructura es común a otras proteínas transmembrana de tipo II como la proteína 2 de membrana asociada a vesícula (VAMP 2)/sinaptobrevina-2 y la syntaxina; ambos receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNAREs, de su nombre en inglés *Soluble NSF Attachment protein REceptor*), que median la preparación y fusión de vesículas sinápticas (SVs) con la membrana plasmática en la sinapsis. En muchos estudios se ha visto que PRRT2 se expresa en el sistema nervioso: en el córtex, el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo (Lee et al., 2012), todas ellas regiones supuestamente involucradas en la patogénesis de las enfermedades ligadas a PRRT2. La localización dentro de la neurona de PRRT2, hace pensar que participa en un conjunto de posibles interacciones proteína-proteína intracelulares. En vista de su dominio N-terminal rico en prolina, también pueden hipotetizarse interacciones de PRRT2 con proteínas portadoras de dominios SH3 implicadas en la transducción de señales y en el ciclo exocitótico de SVs (Valtorta et al., 2016).

Utilizando experimentos de doble híbrido en levadura, se identificó la interacción de PRRT2 con la proteína de 25 KDa asociada al sinaptosoma (SNAP-25) (Stelzl et al., 2005), confirmándose después con experimentos *in vivo* e *in vitro* de co-inmunoprecipitación, revelando además que no se daba interacción con una de las formas truncadas de la proteína (p.R217Pfs*8) (Lee et al., 2012; Li et al., 2015).

INTRODUCCIÓN

SNAP-25 es una de las 3 proteínas SNARE presinápticas que dirigen la exocitosis de SV. PRRT2 se localiza en los axones, con una mayor concentración en puntos de sinapsis (Lee et al., 2012), indicando que PRRT2 podría ser una proteína presináptica (Heron & Dibbens, 2013; Valente et al., 2016). Coleman et al. descubrieron un papel crucial de PRRT2 como regulador de la liberación sináptica de neurotransmisores, mediada por SNARE, en la sinapsis. Las mutaciones en PRRT2, ya sea que produzcan cambios en la de lectura del gen (ARNm que se degrada por la ruta *nonsense mediated RNA decay*⁷) o bien afecten a los sitios implicados en la regulación del ensamblaje del complejo SNARE, causan la pérdida de la función de la proteína y alteran la neurotransmisión. Estos resultados relacionan los trastornos paroxísticos con la exocitosis vesicular presináptica anormal (Coleman et al., 2018).

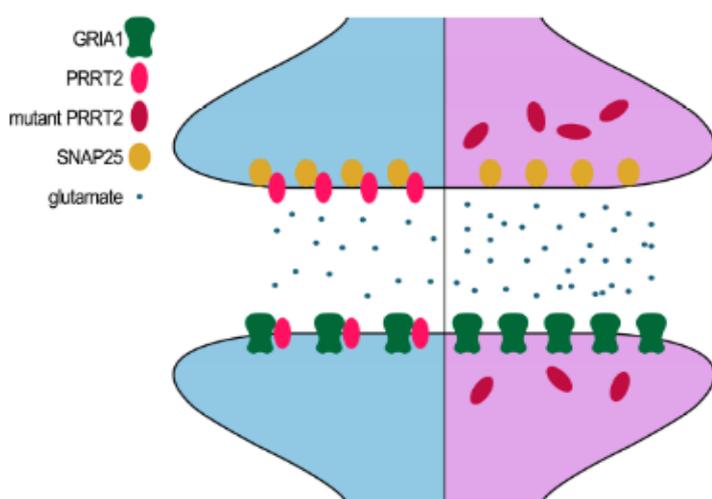


Figura 1.5. Representación esquemática de la ruta de señalización del glutamato y su alteración por PRRT2 mutante. Con PRRT2 silvestre (parte izquierda) y PRRT2 mutante (parte derecha) (Li et al, 2015).

ionotrópicos que están formados por cuatro subunidades internas diferentes de GRIA 1-4. Se ha observado que PRRT2 limita la distribución de GRIA en la membrana postsináptica, y la inmunoreactividad de PRRT2 ha sido localizada en la punta de las espinas dendríticas. Además, se observaron unos niveles mayores de glutamato en las muestras de plasma de pacientes con PKD, y tras hacer un estudio en ratones con lentivirus que portaban una secuencia de *short-hairpin RNA* (shRNA) que daba lugar a la proteína truncada, se confirmó el aumento los niveles de glutamato. El mecanismo que tiene lugar está representado en la figura 1.5 (Li et al., 2015).

También se ha observado que PRRT2 juega un papel en el compartimento postsináptico, dada su interacción con la subunidad GluA1 (GRIA1) del complejo del receptor de glutamato tipo AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) sugerida por estudios proteómicos y de co-inmunoprecipitación. El receptor AMPA es uno de los receptores de glutamato

⁷ La ruta nonsense-mediated mRNA decay (NMD) es un mecanismo regulatorio transcripcional que degrada eficientemente ARNs mensajeros con codones de terminación prematuros para disminuir la producción de proteínas truncadas potencialmente deletéreas (Wu et al., 2014)

También se ha demostrado que PRRT2 interactúa específicamente y con gran afinidad con las sinaptotagminas 1 y 2 (Syts 1 y 2), los principales sensores de Ca^{2+} que median la activación de la liberación rápida y sincronizada de neurotransmisores (Valente et al., 2016). Mediante un estudio con células madre pluripotentes inducibles (iPSC) de dos hermanos homocigotos y heterocigotos para la mutación c.649dupC diferenciadas a neuronas humanas se demostró que PRRT2 es un importante modulador negativo de los canales de sodio $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.6$ y que la falta de PRRT2 lleva a una hiperactividad del canal de Na^+ en neuronas humanas y de ratón (Fruscione et al., 2018).

El silenciamiento de PRRT2 también provoca defectos en la estructura y función sináptica, disminuyendo el número de contactos sinápticos y en menor medida, los cambios en la ultraestructura sináptica, dando lugar a una pequeña reducción del volumen de SV y un aumento de las SVs acumuladas en el sitio de liberación (Liu et al., 2016; Valente et al., 2016).

Todas estas interacciones, proporcionan una base molecular para establecer la función de la proteína PRRT2 y la forma de interacción con el resto de proteínas del complejo SNARE, como se muestra en la figura 1.6.

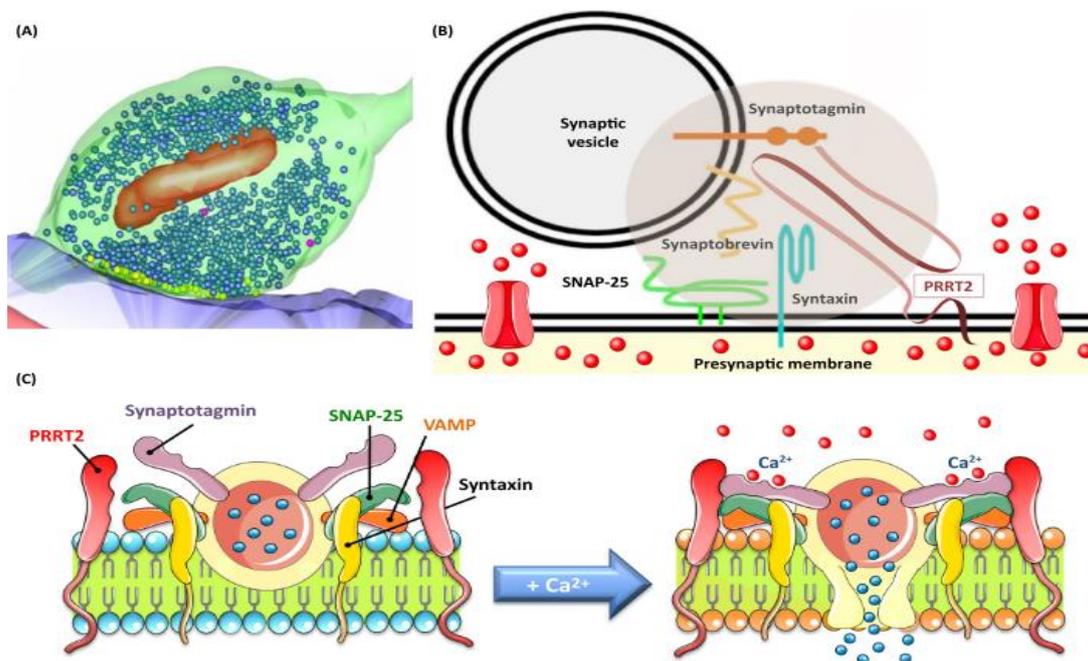


Figura 1.6. Representación esquemática del papel de la proteína PRRT2 en la sinapsis y su interacción con el SNARE. (A) Reconstrucción de la ultraestructura presináptica terminal. (B) PRRT2 asociada a la membrana plasmática presináptica, interaccionando con los componentes del complejo de receptores de proteínas de fijación soluble a NSF (SNARE). (C) Modelo del mecanismo para el papel de PRRT2 en la exocitosis rápida de vesículas sinápticas (SVs). En reposo (izquierda), PRRT2 está cerca del sensor de Ca^{2+} sinaptotagmina y del complejo SNARE. Tras la estimulación, cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} , PRRT2 interactúa con las proteínas SNARE y sinaptotagmina. Como consecuencia, PRRT2 dota al complejo SNARE de sensibilidad al Ca^{2+} y aumenta la probabilidad de liberación de neurotransmisores (Valtorta et al., 2016).

INTRODUCCIÓN

Además de la isoforma principal (isoforma 1), se han descrito otras dos isoformas de PRRT2 humanas procedentes de *splicing* alternativo, que comparten la gran mayoría de la región N-terminal (donde se localizan la mayoría de mutaciones). La isoforma 2 (394 residuos) tiene una región C-terminal extendida, mientras que la isoforma 3 (299 residuos) es una versión truncada de la isoforma 1 (Valtorta et al., 2016)

La mayoría de las mutaciones en PRRT2 son muy penetrantes y dan lugar a una proteína truncada. La mutación más frecuente es un cambio en la pauta de lectura localizada en una región inestable de nueve citosinas, causando la introducción de un codón de parada siete aminoácidos después de la inserción (c.649–650insC, p.R217Pfs*7). Existen otras mutaciones de codón de parada o de cambio en la pauta de lectura, que se dan principalmente en el largo dominio N-terminal de la proteína, dispersas en la zona rica en prolina, y solo unas pocas involucran los dominios transmembrana o el bucle citoplasmático (Rossi et al., 2016). En la figura 1.7 se pueden ver algunas mutaciones mapeadas en los dominios de la proteína.

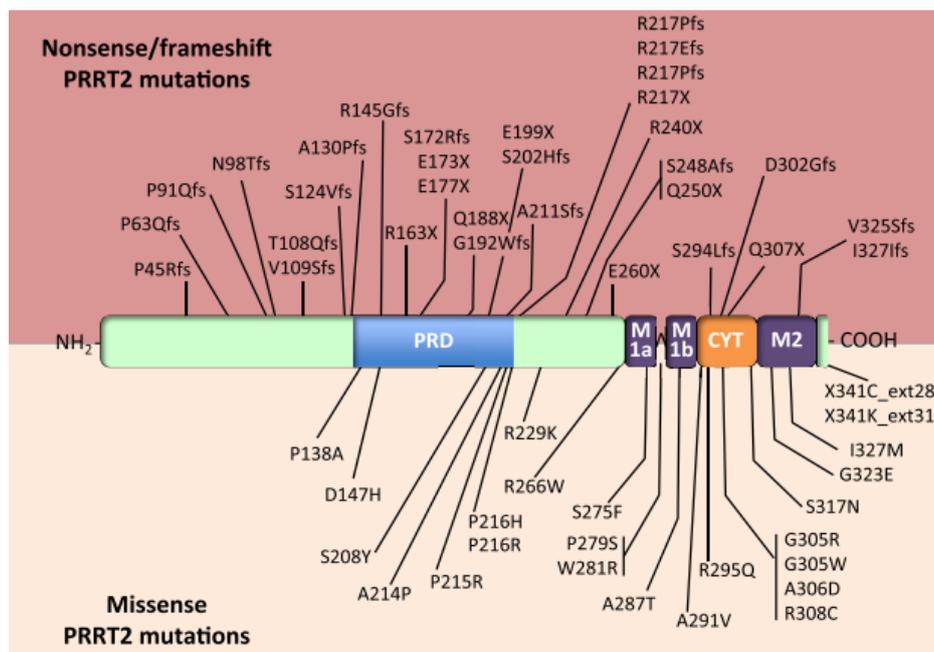


Figura 1.7. Mutaciones mapeadas en la proteína PRRT2. Mutaciones de codón de parada/de cambio de pauta de lectura y mutaciones de cambio de amino ácido representadas en los dominios de la proteína en el panel de arriba y el de abajo, respectivamente (Valtorta et al., 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, el ARNm con mutaciones que llevan a una proteína truncada podría ser degradado por el sistema nonsense-mediated mRNA decay o podría expresarse y traducirse a proteína que es rápidamente degradada, como se ha sugerido por la falta de expresión en experimentos con líneas celulares y la alta tasa de mutaciones que dan proteínas truncadas (Lee et al., 2012; Méneret et al., 2012; Rossi et al., 2016; Wu et al., 2014). Además, se ha observado que una pequeña proporción de proteína truncada no degradada

cambia su localización celular (figura 1.8.), lo que podría resultar en la alteración de las funciones de PRRT2 (Wu et al., 2014)

Por lo tanto, el mecanismo potencial que subyace en varias enfermedades relacionadas con PRRT2, como en este caso la PKD, podría explicarse por medio de las interacciones y funciones de PRRT2 descritas. PRRT2 participa en funciones sinápticas a través de interacciones con SNAP25 y otras moléculas del complejo AMPAR. Las mutaciones PRRT2 causan una expresión reducida y/o una localización anormal intracelular de la proteína, lo que conduce a la pérdida de su función. Esta pérdida de función puede provocar un retraso en la migración neuronal y la pérdida sináptica. Los diversos efectos patológicos de las mutaciones, a su vez contribuyen al amplio espectro fenotípico, desde la PKD por mutaciones heterocigotas, hasta la encefalopatía congénita grave por mutaciones homocigotas (Liu et al., 2016).

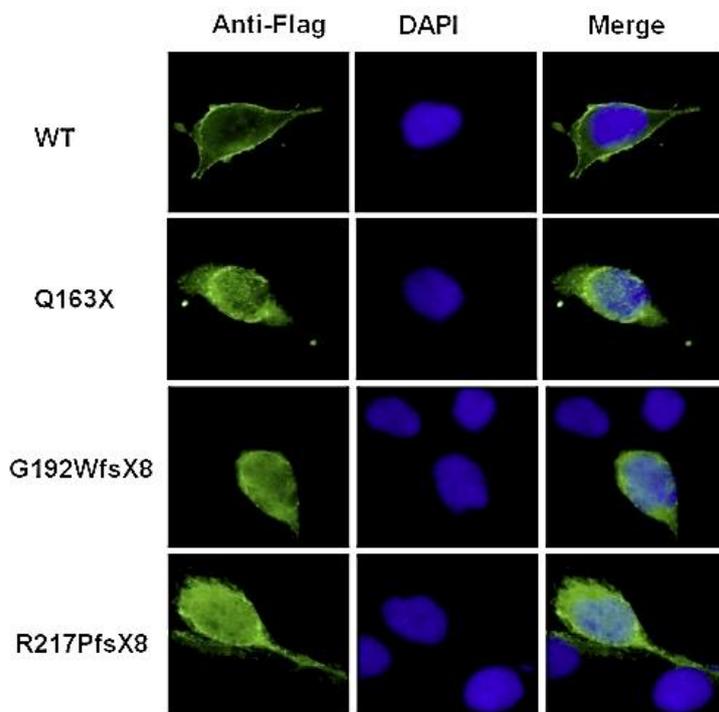


Figura 1.8. Detección de la localización de la proteína PRRT2 mutante in vitro por microscopía confocal. Como se puede observar, PRRT2 silvestre (WT) co-localiza principalmente en la membrana de las células SH-SY5Y (panel superior); mientras que la PRRT2 mutante (con mutaciones Q163X, G192WfsX8 y R217PfsX8) co-localiza principalmente en el citoplasma (panel inferior) Flag-PRRT2-verde; núcleo-DAPI-azul; n = 3 (Wu et al., 2014)

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS

Debido al desconocimiento que hay todavía del mecanismo que lleva a desencadenar la PKD y la pleiotropía del gen *PRRT2*, se ha fijado como objetivo el estudio de la variante de *PRRT2* encontrada previamente en una familia con PKD en la Unidad de Genética Molecular del IBV-CSIC, p.Q106X, que da lugar a una proteína truncada, comparándola con la forma silvestre y otras mutantes relacionadas con la enfermedad, que dan también proteínas truncadas (p.Q163X y p.Q256X). Para abordar este objetivo general, se postulan los siguientes objetivos parciales:

- 1) Estudio de la expresión de las variantes de *PRRT2* mediante qPCR
- 2) Estudio de la expresión de las variantes de *PRRT2* mediante *Western-blot*
- 3) Comparativa de expresión de las variantes de *PRRT2* al utilizar un inhibidor de la ruta NMD (NMDI14).
- 4) Estudio de la interacción de las variantes de *PRRT2* con SNAP-25, Syt1 y Syt2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados se recogen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados. Se indica el nombre de cada uno, su descripción y el uso que se le ha dado en el presente proyecto.

| Plásmido | Descripción | Uso |
|---|---|--|
| pFlag- Kan^R | Vector de expresión diseñado en un proyecto anterior de la UGM, de 4009 pb, con la secuencia de la proteína de fusión Flag en su interior, promotor CMV-IE y resistente a kanamicina (figura 3.1) | Clonación - Vector |
| PRRT2 in pcDNA3.1+ /c-(k)DYK Amp^R | Vector de expresión comercial (GenScript, Clone ID OHu28363), eucariota, construido clonando en el vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK la secuencia del gen PRRT2 humano de 1023pb. Resistente a ampicilina (figura 3.1) | Clonación - Plásmido a partir del cual se amplificaron los insertos |
| pFlag-PRRT2-Q106X Kan^R | Vectores de expresión eucariotas generados en este proyecto. Producto de insertar el fragmento amplificado a partir de PRRT2 in pcDNA3.1+/c-(k)DYK Amp ^R en el plásmido pFlag. Resistentes a kanamicina. | Expresión de las variantes Q106X, Q163X y Q250X de PRRT2 en líneas celulares |
| pFlag-PRRT2-Q163X Kan^R | | |
| pFlag-PRRT2-Q250X Kan^R | | |

CMV IE= cytomegalovirus-*immediate early*; GFP = *Green fluorescent protein*; HA= *Human influenza hemagglutinin*; pb = *pares de bases*; SNAP-25 = *synaptosomal-associated protein 25*; Syt = *Sinaptotagmina*

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados. Se indica el nombre de cada uno, su descripción y el uso que se le ha dado en el presente proyecto (continuación).

| Plásmido | Descripción | Uso |
|------------------------------------|--|------------------------|
| SNAP25-GFP Kan^R | Vector de expresión procedente del laboratorio de Pozzan, eucariota, promotor CMV-IE, compuesto por los genes de SNAP-25 y de las proteínas de fusión HA y GFP clonados en el plásmido VR1012 de 4915pb. Es resistente a kanamicina (figura 3.2) | Co-inmunoprecipitación |
| EGFP-E-Syt1 Kan^R | Vector de expresión comercial (Addgene, Clone ID 66830) eucariota, de 8042pb, compuesto por el gen E-Syt1 humano fusionado con la proteína GFP y clonado en el plásmido pEGFP-C1. Resistente a kanamicina (figura 3.2) | |
| EGFP-E-Syt2 Kan^R | Vector de expresión comercial (Addgene, Clone ID 66831) eucariota, de 8042pb, compuesto por el gen E-Syt2 humano fusionado con la proteína GFP y clonado en el plásmido pEGFP-C1. Resistente a kanamicina (figura 3.2) | |

CMV IE= cytomegalovirus-immediate early; GFP = Green fluorescent protein; HA= Human influenza hemagglutinin; pb = pares de bases; SNAP-25 = synaptosomal-associated protein 25; Syt = Sinaptotagmina

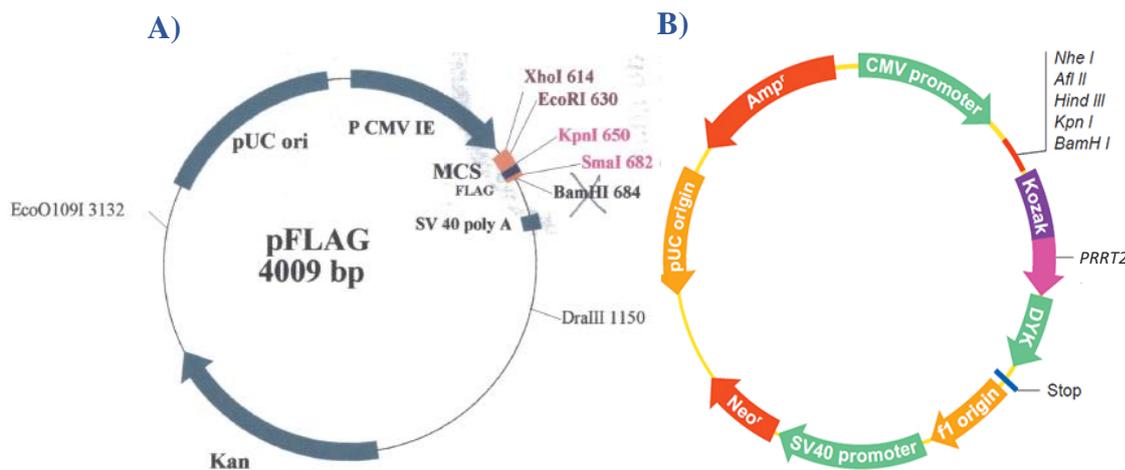


Figura 3.1. Vectores utilizados en el proceso de clonación. (A) pFLAG (B) PRRT2 in pcDNA3.1+/c-(k)DYK Amp^R (Fuente: GeneScript)

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en el proyecto. Se indica el nombre, la secuencia en dirección 5'-3', T_m (*melting temperature*), tamaño del oligonucleótido y su uso en este proyecto. En las secuencias indicadas aparece señalado en rojo el sitio de restricción.

| Nº | Nombre | Secuencia (5' → 3') | T _m (°C) | Tamaño (pb) | Uso |
|------|----------------------|--------------------------------|---------------------|-------------|---|
| 5024 | he_PRRT2_NheI-F | CACAGCTAGCGATGGCAGCCAGCAGCTCT | 67.2 | 29 | Clonación. Amplificación PRRT2 (<i>forward</i>). Sitio de restricción para NheI |
| 5025 | he_PRRT2_SalI_106-R | CACAGTCGACTGGCATGGGTCTTCGGGGCT | 68.5 | 30 | Clonación. Amplificación PRRT2 variante 106 (<i>reverse</i>). Sitio de restricción para SalI |
| 5026 | he_PRRT2_SalI_163-R | CACAGTCGACTGGGTAGGGAGCTCTGGTTG | 67.1 | 30 | Clonación. Amplificación PRRT2 variante 163 (<i>reverse</i>). Sitio de restricción para SalI |
| 5027 | he_PRRT2_SalI_250-R | CACAGTCGACTGGGAGCTGGGGTGGCGGCT | 71.2 | 30 | Clonación. Amplificación PRRT2 variante 250 (<i>reverse</i>). Sitio de restricción para SalI. |
| 5037 | he_PRRT2_SalI-R | CACAGTCGACTGCTTATACACGCCTAAGTT | 61.6 | 30 | Clonación. Amplificación PRRT2 WT (<i>reverse</i>). Sitio de restricción para SalI |
| 5153 | he_PRRT2_qPCR-F | GGCCATTCTGAAGCTGAAACT | 52.4 | 21 | qPCR. Amplificación fragmento PRRT2 (<i>forward</i>) |
| 5154 | he_PRRT2_qPCR-R | CGGGGTCTCTGTGGTTTCT | 53.2 | 19 | qPCR. Amplificación fragmento PRRT2 (<i>reverse</i>) |
| 5151 | he_PRRT2_WT_qPCR-F | CTGTCAACATCGTGGCCTTC | 53.8 | 20 | qPCR. Amplificación PRRT2 (<i>forward</i>) |
| 5152 | he_PRRT2_FLAG_qPCR-R | CTTGTCATCGTCGTCCTTGT | 51.8 | 20 | qPCR. Amplificación FLAG (<i>reverse</i>) |
| 3894 | he_GADPH-F | TGACTTCAACAGCGACACCCA | 60.2 | 21 | qPCR. Amplificación de GADPH (<i>forward</i>) |
| 3895 | He_GADPH-R | CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA | 59.2 | 21 | qPCR. Amplificación de GADPH (<i>reverse</i>) |

3.1.3. Cepa bacteriana

Para realizar este proyecto se utilizó la cepa de *Escherichia coli DH5α*, una cepa bacteriana no patogénica desarrollada a partir de *E.coli*, modificada con mutaciones que la adecúan para su uso en laboratorio y para realizar transformaciones de alta eficacia, siendo su genotipo $\Delta lacZ \Delta M15 \Delta (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1$.

3.1.4. Línea celular

La línea celular utilizada en este proyecto fue la SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) (figura 3.3). Se trata de una línea celular de neuroblastoma humano, descrita por primera vez en 1978, subclonada de la línea celular SK-N-SH que fue aislada de una biopsia de médula ósea

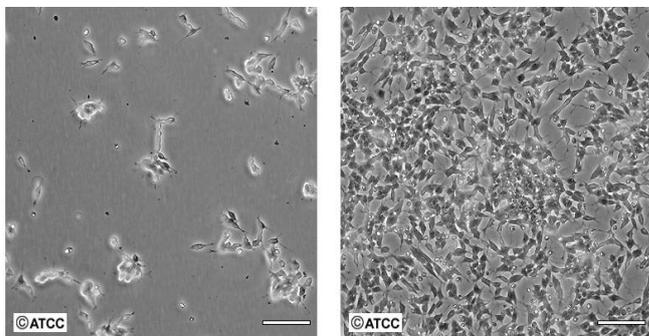


Figura 3.3. Vista de las células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) al microscopio. A baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha). Scale bar = 100 μ m. Fuente: ATCC®

con neuroblastoma. La morfología de sus células es epitelial siendo fácilmente diferenciables a fenotipo neuronal, por lo que es frecuentemente utilizada para estudiar *in vitro* enfermedades del sistema nervioso, como en este caso la PKD. Crece de forma mixta, tanto de forma adherente como en suspensión (Biedler et al., 1978)

3.2. Métodos de cultivo bacteriano

- Para el cultivo de las células *E. coli DH5α* se empleó el medio LB-Kanamicina. Para el cultivo en suspensión, en medio líquido, se disolvieron 40 gramos de LB en polvo (Miller, 02-385, Scharlau) en 1 litro de agua destilada, se autoclavó (15 minutos a 121°C), y una vez que el medio alcanzó los 50°C se añadió kanamicina a una concentración final de 0,1 μ g/ml. Para medio sólido en placas Petri, se utiliza medio con agar (Miller, 01-385, Scharlau), disolviendo 40 gramos de LB-Agar en polvo en 1 litro de agua, autoclavando y añadiendo el antibiótico correspondiente como en el caso anterior, y repartiendo la mezcla en placas.

- Los métodos de cultivos bacterianos son explicados en los siguientes apartados (3.3.1. Obtención de plásmidos y 3.3.2.4. Transformación de células electrocompetentes).

-

3.3. Métodos de extracción, manipulación y análisis de ADN

3.3.1. Obtención de plásmidos (minipreps y midipreps)

A partir de glicerizados bacterianos, se cultivaron las bacterias en suspensión en 3ml (para miniprep) o 50ml (para midiprep) de medio LB con el antibiótico indicado en cada caso (ampicilina a 100 µg/ml y kanamicina a 50 µg/ml de medio LB) a 37°C en agitación o/n. Para la extracción del ADN plasmídico, en el caso de las minipreps, se utilizó un método basado en lisis alcalina descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al. 1989). Para la obtención de MIDIprens se utilizó ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2. Clonación

Una vez extraídos los plásmidos, se realizaron los pasos necesarios para clonar los fragmentos con las variantes seleccionadas para este proyecto (procedentes del plásmido PRRT2 in pcDNA3.1+/c-(k)DYK Amp^R, descrito en la tabla 3.1) en el vector pFlag (también descrito en la tabla 3.1) que se explican a continuación.

3.3.2.1. Amplificación de insertos por PCR

Para realizar la PCR se utilizaron como reactivos agua miliQ, tampón específico para nuestra polimerasa, dNTPs, cebadores directo y reverso (específicos para cada muestra y recogidos en la tabla 3.2), polimerasa *Pfu* Turbo (EP0571, Stratagene) y el ADN plasmídico procedente de miniprep.

Las concentraciones de reactivos por muestra fueron las siguientes: Buffer *Pfu* 1X, 0,1mM de dNTPs, 0,2µM de cebador directo, 0,2µM de cebador reverso, 0,05U/µl de polimerasa *Pfu* Turbo y agua miliQ hasta un volumen de 49µl. A estos tubos se añadió 1µl de ADN plasmídico llegando a un volumen final de 50µl.

El protocolo seleccionado para la PCR consiste en una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 3min; 5 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30s, hibridación a 60°C durante 30s y extensión a 72°C durante 1,5min; 20 ciclos en los que varía la temperatura de hibridación manteniendo constantes el resto de temperaturas, utilizando una rampa de temperatura que iba de 60°C a 50°C (bajando 0,5°C/ciclo, comenzando en el segundo ciclo) durante 30s para aumentar la especificidad de la amplificación y obtener buen rendimiento; y finalmente 10 ciclos en los que la hibridación se realiza a 50°C durante 30s; por último, se introdujo un paso de extensión final de 10 min a 72°C. Este protocolo de PCR se conoce como PCR *touchdown*.

3.3.2.2. Digestión y extracción de gel

Partiendo de los insertos amplificados de las variantes de *PRRT2* que se estudian en este proyecto, se llevó a cabo la digestión de los mismos, así como del vector, para unirlos posteriormente por ligación.

Para esto se buscaron las enzimas de restricción que cortaran en la secuencia de los plásmidos de forma adecuada mediante la herramienta NEBcutter V2.0 (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>, 2018). Las enzimas seleccionadas fueron NheI y Sall, que cortaban en 5' y 3' de *PRRT2*, respectivamente. Se utilizaron versiones FastDigest (Thermo Scientific) de los enzimas, añadiendo 1µl de cada una, con el tampón indicado a concentración 1X (FastDigest Buffer, Thermo Scientific), y agua hasta alcanzar un volumen final de 55µl en caso de los insertos y 40 µl para el vector pFlag. Se dejaron actuar durante 30min a 37°C en el termociclador y a continuación se cargó todo el volumen de las muestras en un gel de agarosa al 0,8% con agente intercalante (peqGREEN, peqlab) y marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Por último, se cortó y pesó la banda y se purificó el ADN con Minelute Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, quedando el ADN en un volumen de 10µl.

3.3.2.3. Desfosforilación y ligación

Para la desfosforilación del vector y ligación se utilizó el Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche). Según la intensidad de las bandas obtenidas en el paso anterior, se utilizó un volumen de 8µl de vector con 1µl de la enzima fosfatasa y tampón a concentración 1X facilitados por el kit. Se incubó durante 15min a 37°C (desfosforilación) y 10min a 72°C (inactivación del enzima).

Se añadieron 1µl de vector desfosforilado y 7µl de inserto (también en función a la intensidad de banda) con el resto de los reactivos del kit a concentración 1X y se dejó durante 10min a temperatura ambiente, tras lo cual se purificó el producto de la ligación con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), en un volumen total de 50µl.

3.3.2.4. Transformación de células electrocompetentes

El siguiente paso fue transformar las células electrocompetentes *E. coli* DH5α con el ADN purificado por electroporación. Se añadieron los 40µl de células electrocompetentes y 10µl del producto purificado a una cubeta de electroporación y se aplicó un pulso de 1700V en el dispositivo Electroporator 2510 (Eppendorf). Seguidamente se recogieron las células con 200µl de medio SOC rico en nutrientes (2% de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM de MgSO₄ y 20mM de glucosa) a temperatura

y se dejaron durante 45 minutos a 37°C en agitación para que exprese el gen de resistencia al antibiótico. Pasado este tiempo, se cultivaron en placas con medio LB-Kanamicina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Tras observarse crecimiento de colonias, se seleccionaron algunas de cada placa para crecer en suspensión individualmente, en 4 ml de medio LB-Kanamicina, de donde 3 ml se utilizaron para extraer el ADN (miniprep) y secuenciar los plásmidos para comprobar que las bacterias habían introducido el plásmido con el inserto correctamente y el ml restante se utilizó para hacer 2 glicerizados por muestra (añadiendo 500µl de glicerol al 50% a 500µl de cultivo) y así poder conservarse durante un mayor periodo de tiempo a -80°C.

Una vez realizada la clonación y extracción del ADN plasmídico por Midiprep de los glicerizados anteriores, se midió la concentración de ADN con Nanodrop 2000 (ThermoFisher), utilizando 1µl de muestra, para determinar la cantidad a transfectar.

3.4. Métodos de cultivos de líneas celulares humana

Las células SH-SY5Y se encuentran almacenadas en crioviales en N₂ líquido. Para eliminar el DMSO presente en el medio de criopreservación, se descongeló una alícuota de la línea celular, se resuspendió en 9 ml de medio completo y se centrifugó 3 minutos a 500 rpm. Tras centrifugarla, se resuspendió el pellet de células en 10 ml de medio completo y se dejó crecer en un frasco Roux a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar aproximadamente el 50-60% de confluencia.

El medio completo empleado se preparó con medio MEM al 88% (MEM with L-glutamine, Lonza), Suero Fetal Bovino al 10% (*HyClone™ Fetal Bovine Serum U.S. Characterized, SH30071, Invitrogen*) inactivado, antibióticos penicilina-estreptomicina y aminoácidos esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 11140-050, Invitrogen).

3.4.1.1. Mantenimiento y tripsinización

Para mantener las células en cultivo debe cambiarse el medio cada dos días para que estas dispongan siempre de los nutrientes necesarios para su crecimiento.

Una vez el frasco alcanzó el 50-60% de confluencia, se subcultivaron en un frasco mayor, para ello se retiró el medio de cultivo por aspiración, se añadió 1ml de Tripsina-EDTA (25300054, ThermoFisher) y se dejó actuar durante 1min a temperatura ambiente, se aspiró la Tripsina y se incubaron las células durante 5min a 37°C y 5% de CO₂, para que se desprendieran completamente de la superficie del frasco. Después se recogieron las células con 10ml de medio de cultivo, realizando varios arrastres, y se centrifugaron durante 3min a 500rpm para eliminar

la Tripsina que pudiera quedar. El pellet de células se resuspendió en 10ml de medio y se añadieron 20ml adicionales para cubrir toda la superficie.

Cuando el frasco llegó aproximadamente al 80% de confluencia se plaquearon 24 placas de 6cm de diámetro siguiendo los pasos anteriores (tripsinización-resuspensión).

3.4.1.2. Transfección

Una vez alcanzado un 70-90% de confluencia en el cultivo celular, se transfectaron las células SH-SY5Y por el método basado en liposomas utilizando el kit *Lipofectamine 2000*, siguiendo las instrucciones del fabricante (*DNA Transfection Reagent Protocol*), para ello, se diluyeron 7µl de Lipofectamina en medio Opti-MEM (Gibco™, 31985062), cuyos componentes permiten reducir la suplementación de suero en al menos un 50%, hasta alcanzar un volumen de 250µl. Se diluyó el ADN con medio Opti-MEM hasta un volumen de 250µl por placa a transfectar y se mezcló con la lipofectamina diluída (proporción 1:1). Se dejó incubar durante 15min a temperatura ambiente y se añadió el complejo DNA-lípido a las células. Se incubó durante 4-6h a 37°C y por último se añadió medio completo hasta 3ml.

Fueron transfectadas 24 placas, la mitad para su posterior extracción de ARN y cuantificación de la expresión por qPCR y la otra mitad para extraer la proteína y realizar Western blot. Además, se co-transfectaron 14 placas adicionales para realizar el experimento de co-inmunoprecipitación (apartado 3.6.4).

En las placas para extraer su ARN, se quiso estudiar el efecto de bloquear la ruta *Nonsense-Mediated mRNA Decay*, por lo que a la mitad de ellas se les añadió el inhibidor de dicha ruta, NMDi14 (50µM al 50% en DMSO) y el mismo volumen de DMSO al 50% a las placas restantes que se utilizan como control. Las células fueron incubadas con este tratamiento durante dos días.

3.5. Métodos de extracción, manipulación y análisis de ARN

3.5.1. Extracción de ARN

La extracción se llevó a cabo con el QIAmp RNA Blood Mini Kit (50) de QIAGEN siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para la purificación del ARN total de un cultivo celular crecido en monocapa.

3.5.2. Cuantificación ARN

Para la cuantificación del ARN extraído se utilizó *Nanodrop 2000* (*Thermofisher*), seleccionando el programa correspondiente y añadiendo 1µl de la muestra a cuantificar. Se

comprobó que la ratio 260/280, que indica la pureza de ácidos nucleicos de la muestra, fuera 2 o superior y que la curva de absorbancia fuera correcta. Los resultados se recogen en la tabla 7.2 del Anexo I.

3.5.3. Tratamiento con DNasas y síntesis de ADNc

El ARN extraído se diluyó de forma que todas las muestras quedaran a la misma concentración y se empleó el kit *RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)* para evitar su degradación por RNasas. Además, las muestras fueron tratadas con DNasa (DNase I, RNase-free, Life Technologies) para degradar el ADN que pueda haber y evitar su posterior amplificación. Los volúmenes utilizados fueron 0,25µl de RNase OUT, 0,9µl del buffer y 1,1µl de DNasa en un volumen de 9µl. Se incubaron durante 30min a 37°C para que tuviera lugar la reacción y 10 minutos a 72°C para inactivar la DNasa.

Por último, para sintetizar el ADNc a partir del RNA se utilizó el método de los hexámeros aleatorios, realizando toda la manipulación en frío y con material libre de RNasas. Se añadió 1,5µl de oligo (hexámeros) a 6µM y se incubó durante 10min a 65°C para que tuviera lugar el anillamiento. Al pasar este tiempo, se utilizó el kit *Expand Reverse Transcriptase (Roche)* para la síntesis de ADNc, añadiendo 4µl de tampón 5X, 2µl de DTT, 2µl de dNTPS 10mM, 0,5µl de RNase OUT y 1µl de transcriptasa reversa. Por último, se incubó durante 10min a 30°C y durante 1h a 42°C en un termociclador para que tuviera lugar la reacción.

3.5.4. qPCR

La qPCR se realizó en un equipo Fast 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). En cada pocillo de la placa se añadió 7,5µL Fast SYBR(R) Green Master Mix, 1µL de cada oligo a 10µM, ADNc en función a la concentración de cada muestra (tabla 4.1) y 4,5µL de agua miliQ autoclavada. Para la qPCR del constitutivo (GADPH) se añadió el mismo volumen de ADNc, diluido 1:10, debido a su mayor expresión. Los cebadores elegidos para realizarla se muestran en la tabla 3.2. Los datos obtenidos fueron analizados con el método del doble delta CT y se evaluaron los resultados.

3.6. Métodos de extracción, manipulación y análisis de proteínas

3.6.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales de las células se utilizó el tampón RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, SDS 0,1% Deoxicolato sódico 0,5%, Triton x100 e inhibidor de proteasas). Se eliminó el medio de las placas de cultivo, se lavaron con PBS frío, se les añadió 350µL de tampón RIPA y se dejaron en frío durante 5 minutos.

Para aumentar la eficiencia de la extracción deshaciendo los agregados insolubles, se sonicó la muestra en un Bioruptor (Diagenode) con 15 ciclos de pulsos de 20s (potencia media) alternados con 45s sin pulso. Por último, se centrifugó la muestra en frío a 12000rpm durante 10min, guardando tanto el sobrenadante, donde se encuentran la mayor parte de las proteínas, como el precipitado.

3.6.2. Cuantificación de proteínas

3.6.2.1. Cuantificación fluorométrica con Qubit

La cuantificación de proteínas basada en fluorescencia con un fluorímetro Qubit (Invitrogen) se realizó empleando el kit de Quant-iT™ Protein Assays (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, diluyendo reactivo Quant-iT™ en Quant-iT™ buffer (1:200). Después se prepararon las muestras añadiendo a 199µl de esta mezcla 1µl de muestra y las tres disoluciones estándar, cada una con 190µl de mezcla y 10µl de disolución estándar facilitada por el kit. Se mezclaron bien y se incubaron 15min a temperatura ambiente. Se seleccionó el ensayo de proteínas y se calibró el dispositivo con las tres soluciones estándar. Seguidamente se fueron introduciendo las muestras una a una en el dispositivo y midiendo la concentración. Por último, se multiplicaron las concentraciones obtenidas por el factor de dilución, obteniendo concentraciones en µg/ml. Estas se recogen en la tabla 7.3 del Anexo I

3.6.2.2. Cuantificación por método Bradford

El ensayo Bradford, es una técnica analítica espectroscópica que nos permite medir con precisión y rapidez la concentración de proteínas total de una muestra en función a la composición de aminoácidos. Para realizarlo se prepararon disoluciones patrón, a partir de 5µl de una proteína de concentración conocida (de 0 a 100mg/ml) mezclada con 895µl de reactivo Bradford y el mismo volumen de reactivo con 5µl de las muestras de concentración a medir. Se incubaron las muestras por 5min y se midió su absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro UV/V Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences). A partir de estos valores (tabla 7.5 del Anexo I) se construyó una recta patrón (figura 7.3 del Anexo I) y se calculó la concentración de cada muestra interpolando su absorbancia en la recta. Por último, se multiplicó por el factor de dilución. Las concentraciones están recogidas en la tabla 7.6 del Anexo I.

3.6.3. Western blot

Para separar las proteínas celulares en función de su tamaño y poder detectar después nuestra proteína de interés, se realizó una electroforesis vertical SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%. Se añadió tampón de carga Laemmli 5X (250mM Tris HCl pH 6,8, 40% Glicerol, 4% SDS, 0,005% azul de bromofenol y 10% de β-mercaptoetanol) a un volumen de

MATERIALES Y MÉTODOS

muestra en base a la concentración obtenida con Qubit y se incubaron 10min a 95°C para desnaturalizar las proteínas, manteniéndolas después en hielo. Se cargaron en el gel y se migraron aplicando un voltaje continuo de 100V durante aproximadamente 2h. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (1610374, Biorad).

Para realizar la transferencia a membrana se utilizó el tampón de Transferencia al 10% (Tris 25mM, Glicina 0,2M y agua miliQ) con metanol al 10% y agua. Se aplicó un voltaje de 100V durante 2h realizando todo el procedimiento en frío. Para visualizar si se había dado correctamente la transferencia se tiñó la membrana con rojo Ponceau.

Para el bloqueo de la membrana se utilizó tampón de bloqueo a base de leche en polvo (desnatada y sin calcio) al 5% disuelta en TBS Tween al 1% y se dejó 30min en agitación.

Para la inmunodetección de las proteínas se incubó la membrana con el anticuerpo primario, se utilizaron anti-Flag producido en ratón (diluido en tampón de bloqueo en proporción 1:1000) y anti-actina producido en conejo (1:5000), en agitación a 4°C o/n. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10min cada uno con TBS Tween 1X y se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso, cabra anti-ratón IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, SC-2005) y cabra anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, SC-2030) respectivamente, diluido 1:5000 en tampón de bloqueo, durante 1h en agitación a temperatura ambiente. Tras este tiempo se volvieron a realizar 3 lavados de 10min cada uno con TBS Tween 1X.

Para la visualización se utilizó la solución de revelado del kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences, Ref. RPN2232) basada en la quimioluminiscencia, dejando la membrana en un cassette de revelado con esta solución durante 5min. Por último, se visualizó en el sistema ImageQuant LAS 3000 (Fujifilm).

También se realizó *stripping*, proceso basado en la retirada de los anticuerpos primario y secundario de la membrana sin afectar a la proteína, de forma que se puede volver a utilizar. Para ello se incubaron las membranas con tampón de *stripping* ácido (Glicina 0,2M, SDS al 0,1%, Tween20 al 1%, pH 2,2) de 5 a 10min, se descartó el tampón y se volvieron a incubar las placas de 5 a 10min en él. tras 3 lavados de 10min cada uno con TBS Tween se repitió el proceso bloqueando de nuevo la membrana y realizando una nueva inmunodetección.

3.6.4. Co-inmunoprecipitación

Para realizar la técnica de co-inmunoprecipitación se co-transfectaron 12 placas de células SH-SY5Y (siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.4.1.2.) con el ADN de las variantes de *PRRT2* (Q106X, Q163X y Q250X), *PRRT2* wt, *Syt1*, *Syt2* y *SNAP25* obtenido

de MIDIprens, de forma que se pudiera estudiar la interacción de Syt1, Syt2 y SNAP25 con cada variante de PRRT2 y PRRT2 silvestre.

Tras este proceso se extrajo la proteína total con tampón RIPA y sonicación (apartado 3.6.1) y al *pool* de proteínas extraído se le añadió 1µl de anticuerpo monoclonal anti-GFP producido en ratón (Sigma, G6539) diluido en 209µl de PBS 1X y se dejó incubar a 4°C en agitación o/n. Después, se añadieron 50µl de *dynabeads* (Protein-G-Mag Sepharose™ Xtra, GE Healthcare) a cada muestra para capturar el anticuerpo primario unido a las proteínas y se incubaron a 4°C en agitación durante 4h. Tras este tiempo se colocaron en una gradilla magnética (MagRak 6, GE Healthcare) para realizar la purificación de las proteínas atrapadas con los *beads* magnéticos, y se realizaron tres lavados con PBS 1X y tampón Tween al 0,2%. En la figura 3.4 se puede ver un esquema del proceso.

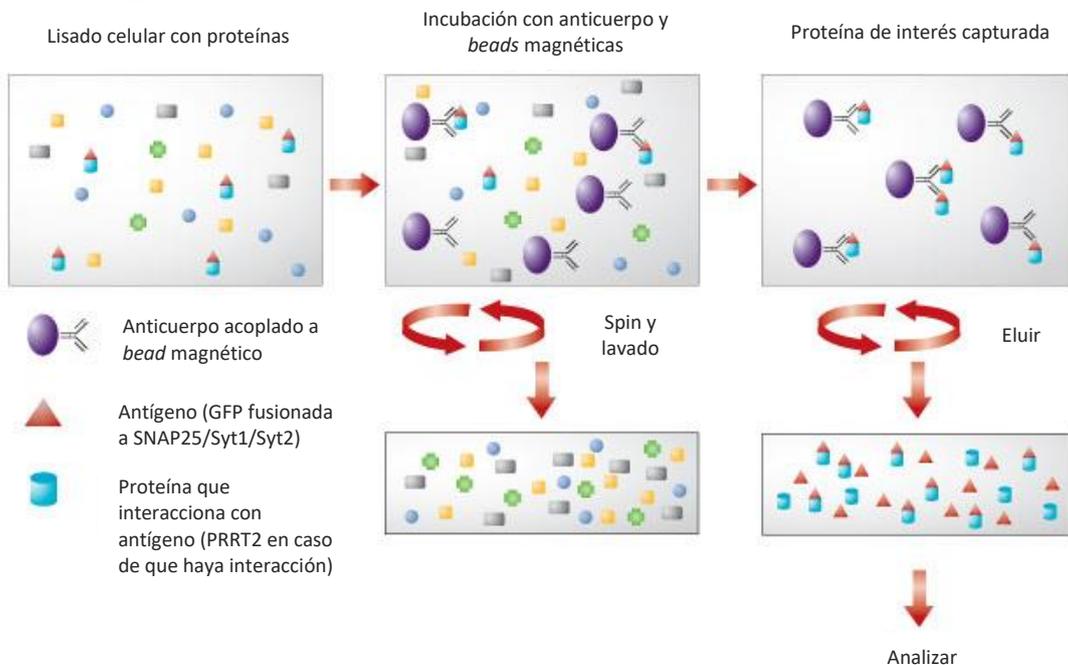


Figura 3.4. Representación esquemática del proceso de co-immunoprecipitación. Fuente: adaptado de ThermoFisher Scientific.

Una vez purificada la proteína se realizó un Western blot de la manera habitual, como se explica en el apartado anterior (3.6.2) utilizando para la inmunodetección el anticuerpo primario anti-Flag producido en conejo (que detecta la proteína Flag unida en este caso a PRRT2) y el anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, SC-2301). Para poder comprobar después la interacción entre proteínas se realizó un *stripping* y se repitió la inmunodetección con el anticuerpo primario anti-GFP producido en conejo (que detecta la proteína GFP unida en este caso a SNAP25/Syt1/Syt2) y el mismo anticuerpo secundario que en el caso anterior.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Expresión de las variantes de *PRRT2* con y sin NMDi mediante qPCR

Tras la incubación de la mitad de las placas de SH-SY5Y con NMDi, el ARN obtenido de las mismas (figura 4.1) se pasó a ADNc y se utilizó para comparar la expresión de las variantes de *PRRT2* elegidas para este proyecto (Q106X, Q163X, Q250X) con la forma silvestre mediante qPCR. También se cultivaron células sin transfectar (Mock) y con el plásmido pFlág (sin inserto) como controles.

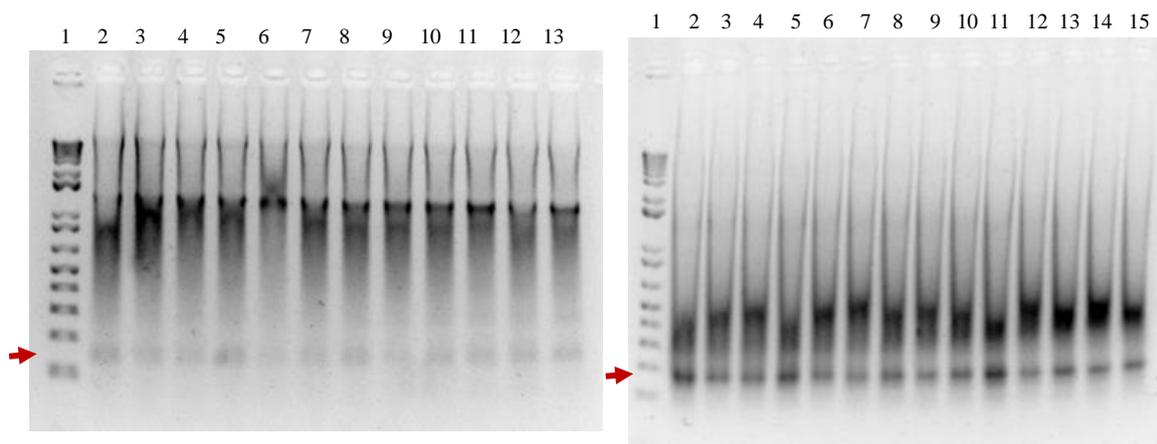


Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ARN. A la izquierda, carril 1: Marcador de peso molecular; 2 y 3: Q106X; 4: Q163X; 5: Q250X; 6: WT; 7: Mock; 8-13: misma disposición de muestras con NMDi. A la derecha, carril 1: Marcador de peso molecular; 2-4: Q106X; 5: Q163X; 6: Q250X; 7: WT; 8: Flag; 9-15: Misma disposición de muestras con NMDi. La altura a la que aparecen las bandas aparece señalada con una flecha roja.

Para ello, previamente se realizaron varias PCRs a tiempo final con los oligonucleótidos señalados en la tabla 3.2. para amplificar *GADPH* (figuras 4.2 y 4.5), *Flag* (figura 4.3) y *PRRT2* (figura 4.4) con la finalidad de verificar la expresión de todas las muestras y la especificidad de los cebadores.

GADPH codifica una proteína perteneciente a la familia de las gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas, es un gen que suele expresarse a altos niveles de manera estable y constitutiva en muchos tejidos y células, por lo que es considerado un gen *housekeeping*, usado como control positivo. Por ello, era de esperar que se expresara en todas nuestras muestras excepto en el control negativo. Tras realizar la PCR para amplificar *GADPH* y cargarlo en el gel de agarosa, se obtuvieron amplicones con el tamaño próximo al esperado (174pb) (figura 4.2) en todas las variantes excepto en la segunda repetición de Q106X y en Q163X con NMDi del primer gel. La concentración de ambas era inferior al resto al medirla con Nanodrop, como muestra la tabla 4.1. Esto pudo ser a causa de un error en su preparación. Y de Q106X NMDi en el segundo gel, posiblemente por los mismos motivos o un error al cargar el gel.

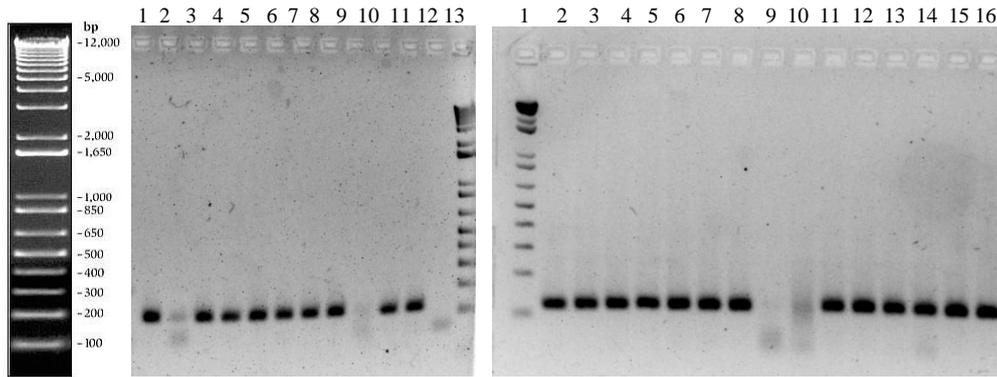


Figura 4.2. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando GADPH. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular empleado (1Kb Plus DNA Ladder). El tamaño esperado para estos amplicones es de 174pb, aproximadamente lo que se observa en la figura. En el gel de la izquierda, carril 1-2: Q106X; 3: Q163X; 4: Q250X; 5: WT; 6: Mock; 7-11: mismo orden de muestras con NMDi excepto Q250X (no se cargó por su baja concentración de ADNc al medir con Nanodrop); 12: control negativo; 13: marcador de peso molecular. En el de la derecha, carril 1: marcador de peso molecular; 2-4: Q106X; 5: Q163; 6: Q250X; 7: WT; 8: Flag; 9: control negativo; 10-16: mismo orden de muestras con NMDi.

Tabla 4.1. Concentración de ADNc medida con Nanodrop

| | | Concentración ADNc (ng/ µl) | |
|--------------|-----------------|-----------------------------|----------|
| | | Sin NMDi | Con NMDi |
| Repetición 1 | Muestra | | |
| | Q106X-1 | 2187,3 | 2122,4 |
| | Q106X-2 | 1861,0 | 2223,4 |
| | Q163X | 2394,4 | 1284,0 |
| | Q250X | 2356,6 | 177,4 |
| | <i>PRRT2</i> wt | 2307,6 | 2053,8 |
| | Mock | 2755,2 | 2335,0 |
| Repetición 2 | Q106X-1 | 2014,9 | 1957,9 |
| | Q106X-2 | 2011,7 | 1939,1 |
| | Q106X-3 | 2086,0 | 2158,8 |
| | Q163X | 2166,7 | 1945,2 |
| | Q250X | 2108,7 | 2052,8 |
| | <i>PRRT2</i> wt | 2474,4 | 1978,9 |
| | Flag | 2066,5 | 1992,9 |

Por otra parte, como control de expresión del vector se utilizó una pareja de oligonucleótidos en la que el sentido amplificaba al final de *PRRT2* y el antisentido en *Flag*. De esta forma sólo se esperaba banda en aquellas muestras en las que el vector se hubiera expresado y tuvieran la secuencia de *PRRT2* del tamaño necesario para que hibridara el oligo (en este caso solo la variante WT). Como se observa en la figura 4.3, los amplicones obtenidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fueron de un tamaño aproximado al esperado (216pb). En el gel las bandas más intensas se corresponden con *PRRT2* silvestre (pocillos 6 y 11).

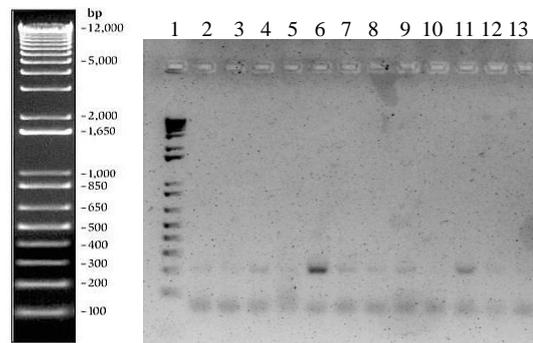


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando *Flag*. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular empleado (*1Kb Plus DNA Ladder*). El tamaño esperado para estos amplicones es de 216pb, aproximadamente lo que se observa en la figura. En el gel, carril 1: marcador de peso molecular; 2-3: Q106X; 4: Q163X; 5: Q250X; 6: WT; 7: Mock; 8-12: mismo orden de muestras con NMDi excepto Q250X (no se cargó por su baja concentración de ADNc al medir con Nanodrop); 13: control negativo.

Los cebadores elegidos finalmente para realizar la qPCR fueron los que amplificaban un fragmento de *PRRT2* al inicio de su secuencia y los de *GADPH* como control endógeno (ambos en la tabla 3.2). Se cargaron tres repeticiones de cada muestra con y sin NMDi, y *Flag* y *Mock* como control. En los geles de las PCRs a tiempo final con estos oligos realizadas con los mismos reactivos, volúmenes y muestras que la qPCR (figuras 4.4 y 4.5, respectivamente) se pudo observar que para las muestras de *mock* no se observaba banda y las de *mock* con NMDi aparecen más débiles. Esto fue debido a que tras realizar todos los experimentos no quedó suficiente volumen de estas y se añadieron en dilución 1:10. La ausencia total de banda ha de ser debido a un error técnico.

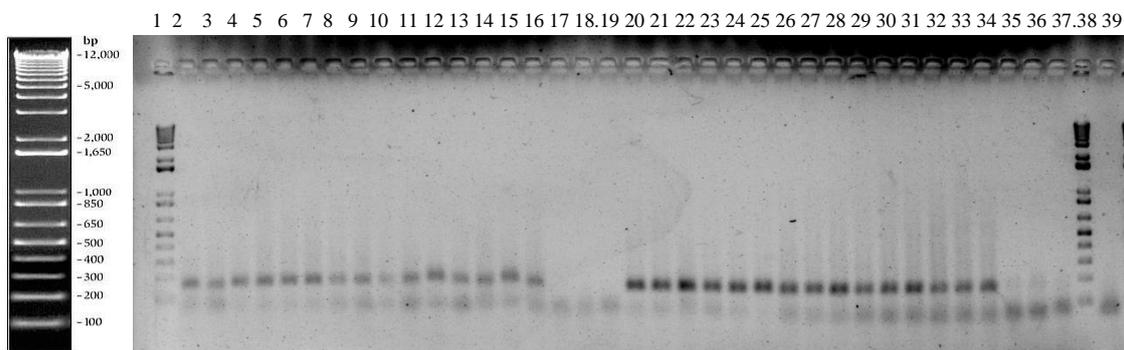


Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando *PRRT2*. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular empleado (*1Kb Plus DNA Ladder*). El tamaño esperado para estos amplicones es de 150pb, aproximadamente lo que se observa en la figura. En el gel, carril 1: marcador de peso molecular; 2-4: Q106X; 5-7: Q163X; 8-10: Q250X; 11-13: WT; 14-16: *Flag*; 17-19: *Mock*; 20-37: mismo orden de muestras con NMDi; 38: marcador de peso molecular; 39: control negativo.

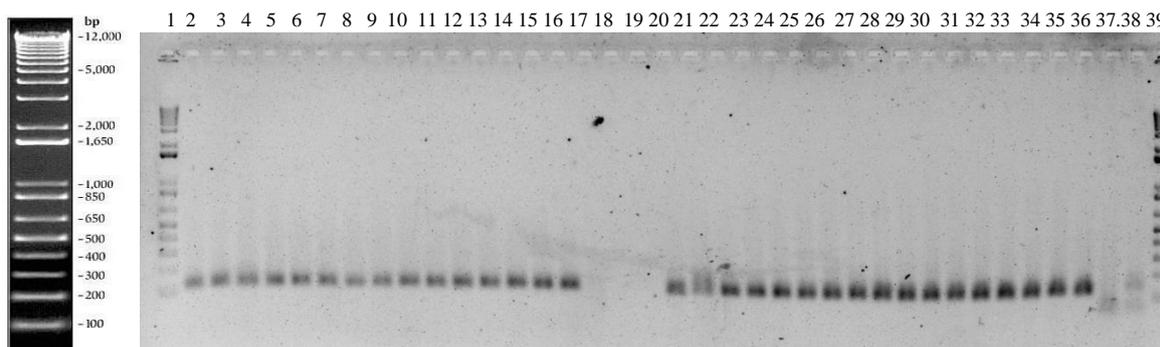


Figura 4.5. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de ADNc amplificando GADPH. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular empleado (1Kb Plus DNA Ladder). El tamaño esperado para estos amplicones es de 174pb, aproximadamente lo que se observa en la figura. En el gel, carril 1: marcador de peso molecular; 2-4: Q106X; 5-7: Q163X; 8-10: Q250X; 11-13: WT; 14-16: Flag; 17-19: Mock; 20-36: mismo orden de muestras con NMDi; 38: control negativo; 39: marcador de peso molecular. La tercera repetición de Mock no se cargó por un error.

Los resultados de qPCR fueron analizados mediante una cuantificación relativa, la cual muestra un cambio en la expresión génica comparándola con muestras de referencia y la expresión de un gen endógeno (*GADPH*). Los cambios en la expresión génica se calcularon con el método *double delta cycle threshold* (DDCt), comparando la expresión de las variantes frente a la de PRRT2 silvestre y de las proteínas con y sin NMDi.

En la figura 4.6 se observan los cambios en la expresión de cada una de las muestras comparada con PRRT2 wt. No se puede determinar un cambio en los niveles de expresión ya que en las proteínas truncadas se observa más expresión que para PRRT2 wt en todas las muestras excepto para Q106X con NMDi y Q163X con NMDi. Por tanto, la ruta NMD aumenta la expresión de las muestras haciendo más comparables sus niveles de expresión, observándose en general una mayor expresión de PRRT2 wt frente las proteínas mutadas. Sin embargo, estos resultados no son consistentes a los mostrados en la literatura, debido a la baja expresión que presentan las muestras.

En la figura 4.7 se representan los cambios en los niveles de expresión de las muestras con y sin NMDi. En general se observa un aumento en la expresión de las muestras con NMDi. En la muestra silvestre, debido a que los niveles de expresión son bajos, un cambio mínimo en estos podría ser la causa de que parezca mayor en comparación con los demás.

Estos resultados indican que los niveles de expresión obtenidos no son suficientes como para realizar una comparación entre ellos, por lo que habría que repetir el experimento cambiando las condiciones para conseguir mayor expresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

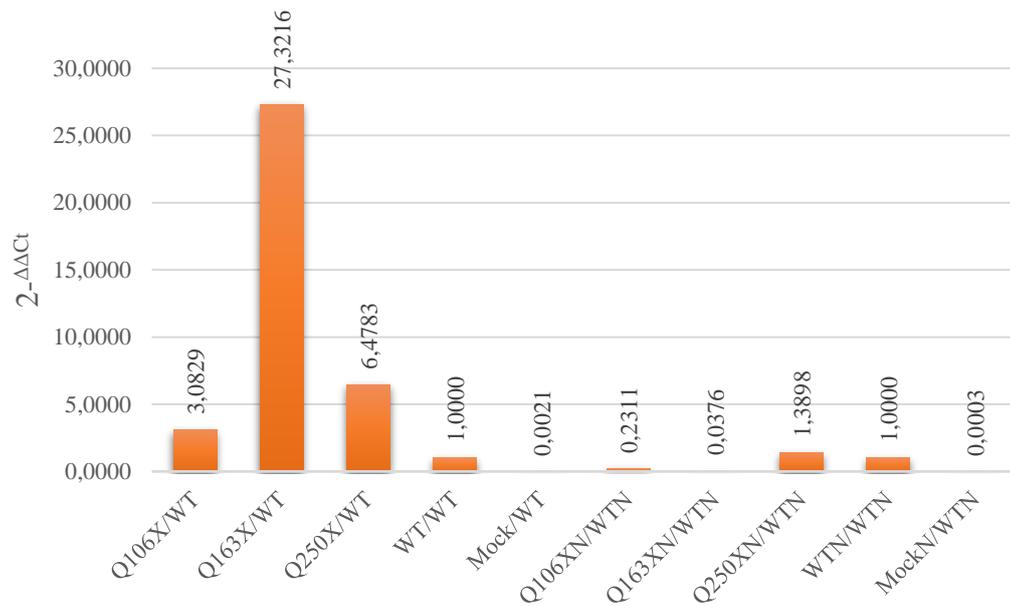


Figura 4.6. Comparación de la expresión entre las muestras y PRRT2 silvestre. Los datos fueron calculados por el método de *double delta cycle threshold* (DDCt) tomando las muestras WT como control y GADPH como control endógeno a partir de los resultados de qPCR.

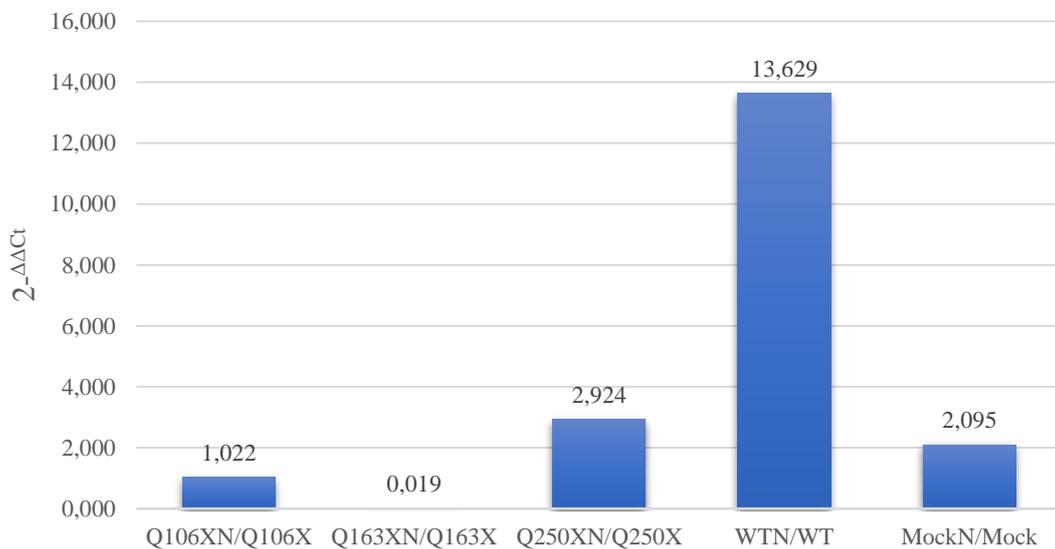


Figura 4.7. Comparación de la expresión entre muestras sin NMDi y con NMDi. Los datos fueron calculados por el método de *double delta cycle threshold* (DDCt) tomando las muestras sin NMDi como control y GADPH como control endógeno a partir de los resultados de qPCR.

4.2. Expresión de las variantes de PRRT2 con y sin NMDi mediante Western blot

Los resultados de Western blot fueron obtenidos tras comprobar que el tamaño de las bandas era el esperado y cuantificando la intensidad de las mismas normalizándolas con las obtenidas tras hacer *stripping* y revelar con actina. Estos datos están representados en la figura 4.8.

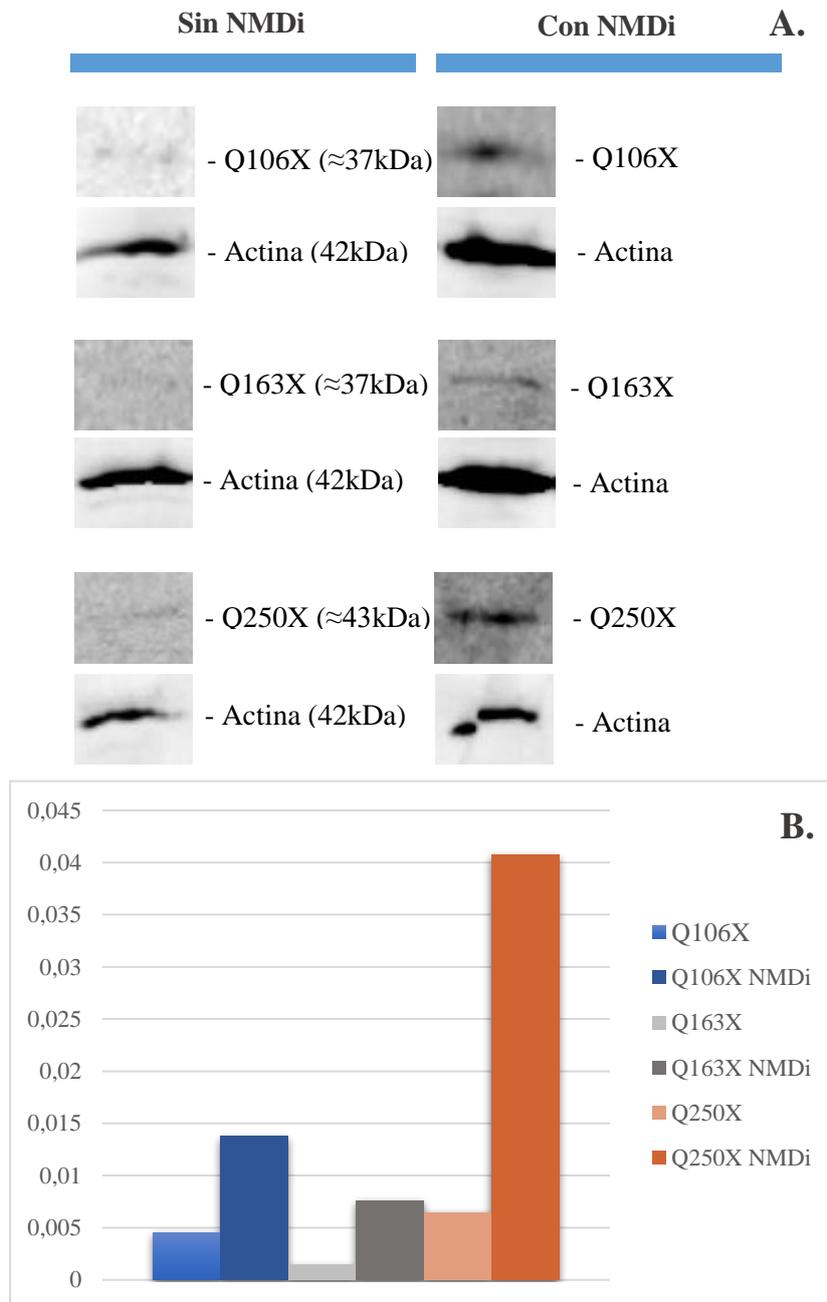


Figura 4.8. Resultados de Western blot. Reveladas con anti-flag-Ms y anti-actina-Rb. (A) Muestras de PRRT2 unida a flag, comparadas con un control endógeno de actina de cada una, sin y con NMDi. (B) Datos de intensidad de banda cuantificados y normalizados con los del control de actina. En ambos casos se observa que las muestras sin NMDi experimentan una menor expresión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tamaños de la proteína PRRT2 y sus variantes Q106X, Q163X y Q250X son 36kDa, 11,2kDa, 17,2kDa y 26,4kDa, respectivamente, ya que todas iban unidas al epítipo flag. En este caso, se observaron bandas para las variantes de PRRT2 a un tamaño que no era el esperado, pero cercano a los resultados mostrados en la literatura, esto puede ser debido a modificaciones postraduccionales de la proteína que influyen al desnaturalizarse con SDS y migrar en el gel.

Sí se pudo observar una diferencia significativa entre la expresión de las variantes con y sin inhibidor de la ruta NMD ($p = 0,02$), por lo que es probable que esta esté implicada en la patogénesis. Sin embargo, estos resultados no son consistentes con los observados en la literatura ya que al darse una baja expresión de la variante silvestre la expresión de la proteína también lo fue y por tanto no se pudo comparar con la de las variantes mutadas.

4.3. Interacción de las variantes de PRRT2 con SNAP-25, Syt1 y Syt2

La co-inmunoprecipitación se realizó para comprobar si las variantes truncadas de las proteínas interactuaban con las proteínas SNAP-25, Syt1 y Syt2, como se ha descrito anteriormente en la literatura (Valente et al., 2016). Para esto se utilizaron las proteínas Syt1, Syt2 y SNAP25 fusionadas con el epítipo GFP expresadas en células SH-SY5Y. GFP tiene un tamaño de 28,7kDa, por lo que los tamaños de banda esperados para estas proteínas son 76,3kDa, 75,6kDa y 52kDa respectivamente. Las muestras de PRRT2 se volvieron a utilizar fusionadas con Flag. Como control positivo se utilizó un plásmido con GFP sin inserto y un plásmido con Flag (plásmido sin inserto de PRRT2) y otro sin transfectar (mock) como controles negativos.

Para este experimento no conseguimos observar las bandas por Western blot para las proteínas Syt1, Syt2 y las variantes de PRRT2 debido a sus bajos niveles de expresión, como se ha ido viendo en el resto de los experimentos. Por lo que no se pudo confirmar la interacción entre proteínas. La proteína SNAP-25 tuvo mayor expresión como se observa en la figura 4.9, por lo que el estudio de la interacción de las variantes de PRRT2 con esta proteína puede ser prometedor para futuros experimentos. En este caso aparecieron bandas inespecíficas por debajo de la de SNAP-25. La baja expresión de SNAP-25 causó que no se observara banda para las muestras con la variante Q250X



Figura 4.9. Resultados de co-inmunoprecipitación de la proteína SNAP-25 en muestras de las variantes (A) Q106X (B) Q250X (C) 163X y (D) WT. La banda correspondiente a SNAP25-GFP aparece aproximadamente a 52kDa. Debajo de ella se dieron bandas inespecíficas. Para Q250X no se observa banda por los bajos niveles de expresión

5. CONCLUSIONES

- Se ha visto que la inhibición de la ruta NMD influye en los niveles de proteínas y ARN mensajero de PRRT2
- Los niveles de expresión no fueron suficientes como para realizar ningún estudio concluyente de los niveles de ARNm y proteínas entre PRRT2 silvestre y las variantes mutadas.
- La baja expresión obtenida con las construcciones plasmídicas no fue suficiente para estudiar la interacción de las proteínas Syt1, Syt2 y SNAP-25 con PRRT2 y sus variantes en la co-inmunoprecipitación.

6. BIBLIOGRAFÍA

BENNETT, L. B., ROACH, E. S., & BOWCOCK, A. M. (2000). A locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia maps to human chromosome 16. *Neurology*, *54*(1), 125–130. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.1.125>

BIEDLER, J. L., ROFFLER-TARLOV, S., SCHACHNER, M., & FREEDMAN, L. S. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*, *38*(November 1972), 3751–3757.

BLAKELEY, J., & JANKOVIC, J. (2002). Secondary paroxysmal dyskinesias. *Movement Disorders*, *17*(4), 726–734. <https://doi.org/10.1002/mds.10178>

BRUNO, M. K., & HALLETT, M. (2011). Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Neurology*, *43533*. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000147298.05983.50>

CHEN, W. J., LIN, Y., XIONG, Z. Q., WEI, W., NI, W., TAN, G. H., ... WU, Z. Y. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nature Genetics*, *43*(12), 1252–1255. <https://doi.org/10.1038/ng.1008>

COLEMAN, J., JOUANNOT, O., RAMAKRISHNAN, S. K., ZANETTI, M. N., WANG, J., SALPIETRO, V., ... KRISHNAKUMAR, S. S. (2018). PRRT2 Regulates Synaptic Fusion by Directly Modulating SNARE Complex Assembly. *Cell Reports*, *22*(3), 820–831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.056>

DEMIRKIRAN, M., & JANKOVIC, J. (1995). Paroxysmal Dyskmesias : Clinical Features and Classification. *Annals of Neurology*, *38*, 571–579.

FRUSCIONE, F., VALENTE, P., STERLINI, B., ROMEI, A., BALDASSARI, S., FADDA, M., ... BENFENATI, F. (2018). PRRT2 controls neuronal excitability by negatively modulating Na⁺-channel 1.2/1.6 activity. *Brain*, *141*(4), 1000–1016. <https://doi.org/10.1093/brain/awy051>

GOODENOUGH, D. J. (1978). Familial and Acquired Paroxysmal Dyskinesias. *Archives of Neurology*, *35*(12), 827–831. <https://doi.org/10.1001/archneur.1978.00500360051010>

HEDERA, P., XIAO, J., PUSCHMANN, A., MOMČILOVIĆ, D., WU, S. W., & LEDOUX, M. S. (2012). Novel PRRT2 mutation in an African-American family with paroxysmal kinesigenic dyskinesia. TL - 12. *BMC Neurology*, *12* VN-r, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-12-93>

HERON, S. E., & DIBBENS, L. M. (2013). Role of PRRT2 in common paroxysmal neurological disorders: A gene with remarkable pleiotrop. *Journal of Medical Genetics*, *50*(3), 133–139. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101406>

KERTESZ, A. (1967). Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. An entity within the paroxysmal choreoathetosis syndrome. Description of 10 cases, including 1 autopsied. *Neurology*, *17*(7), 680–690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6067487>

BIBLIOGRAFÍA

- LANCE, J. W. (1977). Familial paroxysmal dystonic choreoathetosis and its differentiation from related syndromes. *Annals of Neurology*, 2(4), 285–293. <https://doi.org/10.1002/ana.410020405>
- LEE, H., HUANG, Y., BRUNEAU, N., ROLL, P., ROBERSON, E. D. O., HERMANN, M., ... BRUNT, E. R. (2012). Mutations in the novel protein PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell*, 1(1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2011.11.001.Mutations>
- LI, C., MA, Y., ZHANG, K., GU, J., TANG, F., CHEN, S., ... JIN, Y. (2016). Aberrant transcriptional networks in step-wise neurogenesis of paroxysmal kinesigenic dyskinesia-induced pluripotent stem cells. *Oncotarget*, 7(33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10680>
- LI, H.-F., CHEN, W.-J., NI, W., WANG, K.-Y., LIU, G.-L., WANG, N., ... WU, Z.-Y. (2013). PRRT2 mutation correlated with phenotype of paroxysmal kinesigenic dyskinesia and drug response. *Neurology*, 80(16), 1534–1535. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828cf7e1>
- LI, M., NIU, F., ZHU, X., WU, X., SHEN, N., PENG, X., & LIU, Y. (2015). PRRT2 mutant leads to dysfunction of glutamate signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9134–9151. <https://doi.org/10.3390/ijms16059134>
- LIU, D., ZHANG, Y., WANG, Y., CHEN, C., LI, X., ZHOU, J., ... LI, G. (2016). Novel locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia mapped to chromosome 3q28-29. *Scientific Reports*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep25790>
- LIU, Y.-T., NIAN, F.-S., CHOU, W.-J., TAI, C.-Y., KWAN, S.-Y., CHEN, C., ... TSAI, J.-W. (2016). PRRT2 mutations lead to neuronal dysfunction and neurodevelopmental defects. *Oncotarget*, 7(26). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9258>
- LOONG, S. C., & ONG, Y. Y. (1973). Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. Report of a case relieved by L dopa. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 36(6), 921–924. <https://doi.org/10.1136/jnnp.36.6.921>
- MARSDEN, C. D. (1996). Paroxysmal choreoathetosis. *Advances in Neurology*, 70, 467–470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615227>
- MCGUIRE, S., CHANCHANI, S., & KHURANA, D. S. (2018). Paroxysmal Dyskinesias. *Seminars in Pediatric Neurology*, 25, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2017.12.007>
- MÉNERET, A., GRABLI, D., DEPIENNE, C., GAUDEBOUT, C., PICARD, F., DÜRR, A., ... ROZE, E. (2012). PRRT2 mutations : A major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology*, 79(2), 170–174. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31825f06c3>
- MOUNT, L. A., & REBACK, S. (1940). Familial Paroxysmal Choreoathetosis. Preliminary Report on a Hitherto Undescribed Clinical Syndrome. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 44, 841–847.

NAGAMITSU, S., MATSUI, T., HASHIMOTO, K., YAMASHITA, Y., AIHARA, M., SHIMIZU, K., ... SHIMADA, M. (1999). Multicenter study of paroxysmal dyskinesias in Japan--clinical and pedigree analysis. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 14(4), 658–663. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1531-8257%28199907%2914%3A4%3C658%3A%3AAID-MDS1016%3E3.0.CO%3B2-7>

ONO, S., YOSHIURA, K. I., KINOSHITA, A., KIKUCHI, T., NAKANE, Y., KATO, N., ... KUROTAKE, N. (2012). Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *Journal of Human Genetics*, 57(5), 338–341. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.23>

PALAU-BARGUES, J., RUBIO-AGUSTÍ, I., BURGUERA, J. A., VÍLCHEZ-PADILLA, J. J., & VILLANUEVA, V. E. (2010). Discinesia paroxística cinesigénica idiopática familiar: evolución natural y estudio descriptivo en tres familias españolas, 50(7), 390–394.

PRABHAKARA, S., & ANBAZHAGAN, K. (2014). Molecular analysis of PRRT2 gene in a case of paroxysmal kinesigenic dyskinesia patient. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(4), 459. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.144039>

ROSSI, P., STERLINI, B., CASTROFLORIO, E., MARTE, A., ONOFRI, F., VALTORTA, F., ... BENFENATI, F. (2016). A novel topology of proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2): Hints for an intracellular function at the synapse. *Journal of Biological Chemistry*, 291(12), 6111–6123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683888>

SADAMATSU, M., MASUI, A., SAKAI, T., KUNUGI, H., NANKO, S. I., & KATO, N. (1999). Familial paroxysmal kinesigenic choreoathetosis: An electrophysiologic and genotypic analysis. *Epilepsia*, 40(7), 942–949. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00801.x>

SAMBROOK J, FRITSCHI EF AND MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHELOSKY, L. D. (2010). Paroxysmal dyskinesias. In B. Schmitz, B. Tettenborn, & D. L. Schomer (Eds.), *The Paroxysmal Disorders* (pp. 113–129). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511781780.009>

SPACEY, S., & ADAMS, P. (1993). *Familial Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia*. GeneReviews®. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1460/>

STELZL, U., WORM, U., LALOWSKI, M., HAENIG, C., BREMBECK, F. H., GOEHLER, H., ... WANKER, E. E. (2005). A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell*, 122(6), 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.029>

SUN, W., LI, J., ZHU, Y., YAN, X., & WANG, W. (2012). Clinical features of paroxysmal kinesigenic dyskinesia: Report of 24 cases. *Epilepsy and Behavior*, 25(4), 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.06.019>

BIBLIOGRAFÍA

VALENTE, P., CASTROFLORIO, E., ROSSI, P., FADDA, M., STERLINI, B., CERVIGNI, R. I., ... BENFENATI, F. (2016). PRRT2 Is a Key Component of the Ca²⁺-Dependent Neurotransmitter Release Machinery. *Cell Reports*, 15(1), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.005>

VALTORTA, F., BENFENATI, F., ZARA, F., & MELDOLESI, J. (2016). PRRT2: from Paroxysmal Disorders to Regulation of Synaptic Function. *Trends in Neurosciences*, 39(10), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.08.005>

WANG, X., SUN, W., ZHU, X., LI, L., DU, T., MAO, W., ... LIU, Y. (2010). Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis: Evidence of linkage to the pericentromeric region of chromosome 16 in four Chinese families. *European Journal of Neurology*, 17(6), 800–807. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02929.x>

WU, L., TANG, H. D., HUANG, X. J., ZHENG, L., LIU, X. L., WANG, T., ... CHEN, S. DI. (2014). PRRT2 truncated mutations lead to nonsense-mediated mRNA decay in Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20(12), 1399–1404. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.10.012>

7. ANEXO I

Tabla 7.1. Etiología subyacente a las discinesias paroxísticas secundarias o sintomáticas, adaptado de Schelosky, 2010.

| | |
|---|--|
| Discinesias paroxísticas secundarias o sintomáticas | <p>Esclerosis múltiple</p> <p>Enfermedades vasculares (Ataque isquémico transitorio, accidentes cerebrovasculares isquémicos o hemorrágicos)</p> <p>Enfermedad oclusiva de la arteria carótida</p> <p>Encefalopatía hipóxico-isquémica</p> <p>Encefalopatía hipóxica perinatal</p> <p>Malformaciones vasculares corticales</p> <p>Enfermedad de Moyamoya</p> <p>Traumatismo craneal</p> <p>Traumatismo periférico</p> <p>Inflamatorias (infección VIH, encefalitis por CMV, infección PES, sífilis de etapa tardía)</p> <p>Metabólicas ((pseudo)-hipotiroidismo, tirotoxicosis, hipo e hiperglucemia)</p> <p>Calcificaciones de los ganglios basales/ enfermedad de Fahr</p> <p>Kernícterus</p> <p>Migraña con aura</p> <p>Lupus eritematoso</p> <p>Displasia órbito-frontal</p> <p>EOOJA</p> <p>Déficit de succínico semialdehído deshidrogenasa</p> <p>Síndrome Steele-Richardson-Olszewski</p> <p>Linfoma cerebral</p> <p>Síndrome de antifosfolípidos primario</p> <p>Drogas (metilfenidato, fluoxetina)</p> |
|---|--|

Figura 7.1. Sitios de hibridación de los cebadores diseñados para clonación.

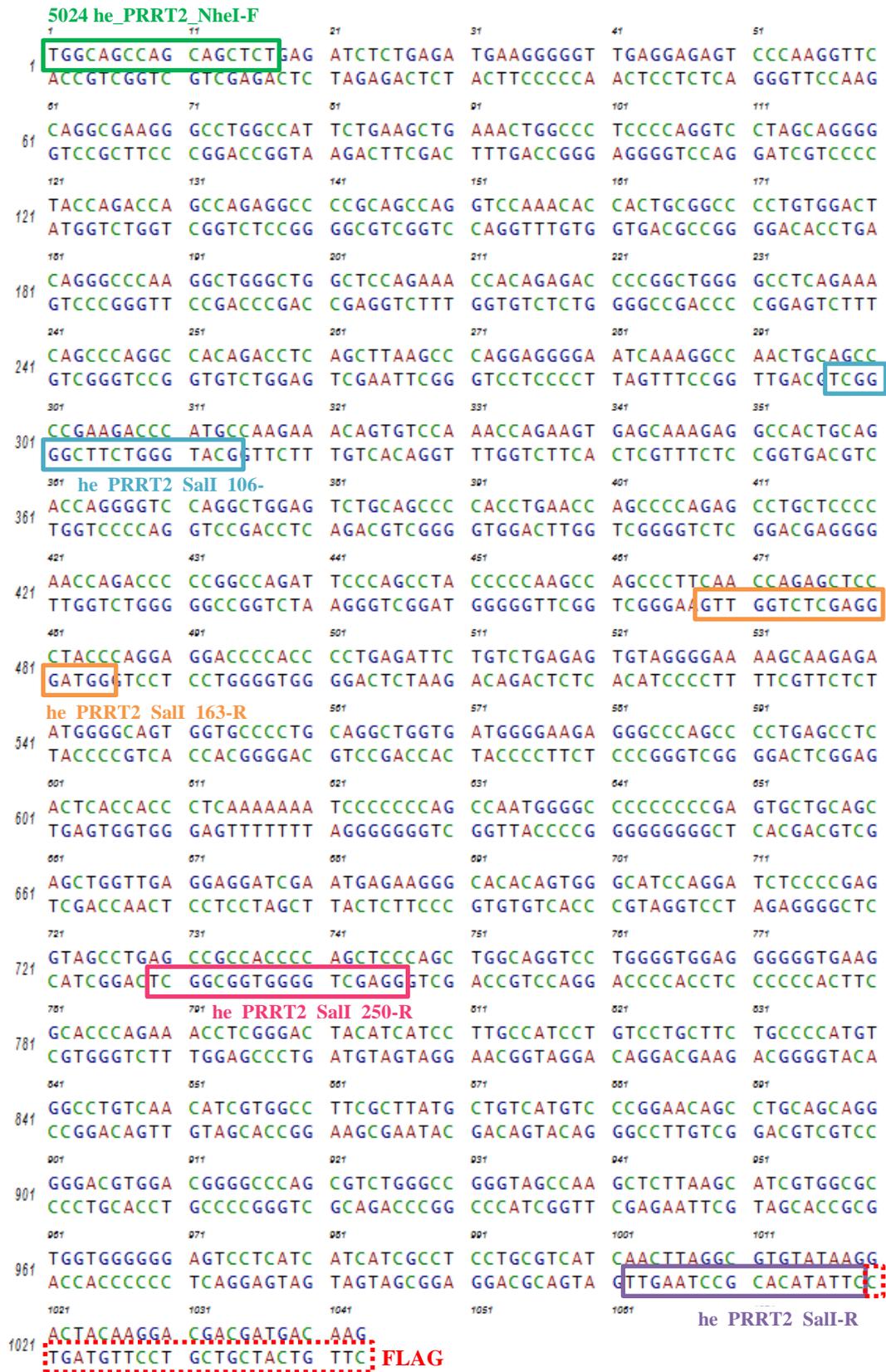


Figura 7.2. Sitios de hibridación de los cebadores diseñados para qPCR.

```

1      11      21      31      41      51
1  TGGCAGCCAG CAGCTCTGAG ATCTCTGAGA TGAAGGGGGT TGAGGAGAGT CCCAAGGTTC
  ACCGTCCGGT GTCGAGACTC TAGAGACTCT ACTTCCCCCA ACTCCTCTCA GGGTTCCAAG
61
61  CAGGCGAAGG GCCTGGCCAT TCTGAAGCTG AAACTGGCCC TCCCCAGGTC CTAGCAGGGG
  GTCCGCTTCC CGGACCCGTA AGACTTCGAC TTTGACCGGG AGGGGTCCAG GATCGTCCCC
121
121  TACCAGACCA GCCAGAGGCC CCGCAGCCAG GTCCAAACAC CACTGCGGCC CCTGTGGACT
  ATGGTCTGGT CGGTCTCCGG GCGTCTGGTC CAGGTTTGTG GTGACGCCGG GGACACCTGA
181
181  CAGGGCCCAA GGCTGGGCTG GCTCCAGAAA CCACAGAGAC CCCGGCTGGG GCCTCAGAAA
  GTCCCGGGTT CCGACCCGAC CGAGGCTCTT GGTGTCTCTG GGGCTGACCC CGGAGTCTTT
241
241  CAGCCCAGGC CACAGACCTC AGCTTAAGCC CAGGAGGGGA ATCAAAGGCC AACTGCAGCC
  GTCGGGTCCG GTGTCTGGAG TCGAATTCGG GTCCTCCCCT TAGTTTCCGG TTGACGTCGG

```

he_PRRT2_qPCR-F

he_PRRT2_qPCR-R

Tabla 7.2. Concentración de ARN extraído de células SH-SY5Y medida con Nanodrop

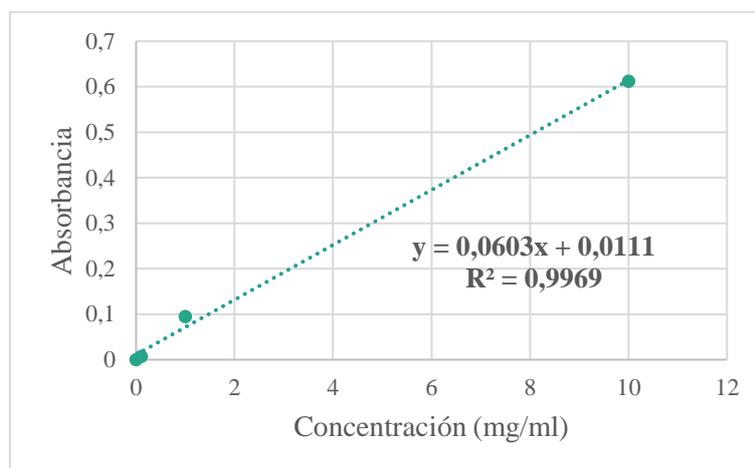
| | | Concentración ARN (ng/ μ l) | |
|--------------|-----------------|---------------------------------|----------|
| Muestra | | Sin NMDi | Con NMDi |
| Repetición 1 | Q106X-1 | 448,7 | 341,7 |
| | Q106X-2 | 295 | 372,2 |
| | Q163X | 361,9 | 323,3 |
| | Q250X | 311,8 | 323,7 |
| | <i>PRRT2</i> wt | 162,1 | 406,5 |
| | Mock | 341,8 | 368,1 |
| Repetición 2 | Q106X-1 | 1668,7 | 1078,4 |
| | Q106X-2 | 1313,3 | 1612,8 |
| | Q106X-3 | 1818,8 | 1238,8 |
| | Q163X | 1510,5 | 1137,2 |
| | Q250X | 1417,8 | 1372 |
| | <i>PRRT2</i> wt | 1163,1 | 1347,6 |
| | Flag | 1504,0 | 1145,1 |

Tabla 7.3. Concentración de proteína de la primera repetición medida con Qubit

| MUESTRA | Concentración proteína (µg/ml) |
|----------------------|---------------------------------------|
| <i>Q106X-1</i> | 4880 |
| <i>Q106X-2</i> | 5000 |
| <i>Q163X</i> | 9680 |
| <i>Q250X</i> | 5200 |
| <i>PRRT2 wt</i> | 7400 |
| <i>Mock</i> | 5000 |
| <i>Q106X-1 NMDi</i> | 10180 |
| <i>Q106X-2 NMDi</i> | 8940 |
| <i>Q163X NMDi</i> | 11060 |
| <i>Q250X NMDi</i> | 8240 |
| <i>PRRT2 wt NMDi</i> | 8900 |
| <i>Mock NMDi</i> | 4720 |

Tabla 7.4. Absorbancia de proteína patrón a concentración conocida para la recta de calibrado (método Bradford)

| Recta de calibrado | |
|-----------------------|-------------|
| Concentración (mg/ml) | Absorbancia |
| 0 | 0 |
| 0,1 | 0,007 |
| 1 | 0,095 |
| 10 | 0,612 |

**Gráfico 7.1.** Recta patrón de proteína (método Bradford)**Tabla 7.5.** Absorbancia medida y concentración de proteína de la segunda repetición calculada a partir de la recta de calibrado (método Bradford).

| Muestra | Absorbancia | Concentración (mg/ml) | Concentración x factor de dilución 5:900 (mg/ml) |
|---------------|-------------|-----------------------|--|
| Q106X-1 | 0,464 | 7,511 | 1351,940 |
| Q163X | 0,447 | 7,229 | 1301,194 |
| Q250X | 0,396 | 6,383 | 1148,955 |
| PRRT2 wt | 0,448 | 7,245 | 1304,179 |
| Flag | 0,460 | 7,444 | 1340,000 |
| Q106X-1 NMDi | 0,487 | 7,892 | 1420,597 |
| Q163X NMDi | 0,752 | 12,286 | 2211,642 |
| Q250X NMDi | 0,490 | 7,942 | 1429,552 |
| PRRT2 wt NMDi | 0,572 | 9,302 | 1674,328 |
| Flag NMDi | 0,481 | 7,793 | 1402,687 |