

**BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *SH3TC2*,
EL GEN RESPONSABLE DE LA ENFERMEDAD DE
CHARCOT-MARIE-TOOTH 4C**

Memoria presentada por

Vincenzo Lupo

para optar al grado de Doctor

Valencia, 2011

Portada:

Sección histológica de nervio ciático de ratón que muestra las capas de mielina que envuelven el axón

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Dña. Carmen Espinós Armero, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora Miguel Servet del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras,

CERTIFICAN:

Que Don **Vincenzo Lupo**, licenciado en Química y Tecnologías Farmacéuticas por la Universidad de Palermo, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Biología celular y molecular de *SH3TC2*, el gen responsable de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 4C".

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctor.

En Valencia, a 20 de Septiembre de 2011

Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. Carmen Espinós Armero

El autor ha disfrutado de las siguientes ayudas durante la realización de la tesis doctoral:

- Beca predoctoral con cargo a proyecto de investigación (**Ref. PI04/00932**), concedida por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Beca predoctoral **I3P (BOE: 27-07-2006)**, concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Contrato asociado a proyecto de investigación (**Ref. PS09/00095**), concedido por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en el CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER).

AGRADECIMIENTOS

Transcurrido estos años, finalmente tengo la ocasión de agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de mi tesis doctoral.

En primer lugar quisiera darle las gracias a mis directores de tesis: **Paco y Carmen**, sin los cuales no hubiera podido llevar a cabo este proyecto de tesis.

Quisiera también dar mil gracias a **mis queridos compañeros del laboratorio**, por transmitirme vitalidad y confianza en el trabajo, y también por su amistad.

A **toda la gente del Instituto de Biomedicina de Valencia**, a todas las personas que trabajan en esta gran familia, que me contagian su ilusión por este trabajo.

Además, quisiera agradecer el apoyo aportado por investigadores de otras instituciones y/o universidades: **Dr. Javier Buesa, Dra. Lynne Yenush, Dr. Fernando Aniento**. Asimismo, a todos los compañeros de la facultad de Farmacia, y en particular al **Dr. Lucas del Castillo Agudo**.

Al **Dr. Roman Chrast** y a la **Dra. Estelle Arnaud**, por concederme la posibilidad de desarrollar una estancia en su laboratorio, realizando parte de mi trabajo de tesis doctoral. Y cómo no, agradecer al resto del equipo del departamento de Génétique Médicale de la Universidad de Lausanne.

ÍNDICE

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN	
1. Neuropatías sensitivo-motoras hereditarias	1
1.1. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	1
1.2. Síndrome de Déjérine-Sottas	2
1.3. Neuropatía hipomielinizante congénita.....	2
1.4. Neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión.....	2
2. Características de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	3
2.1. Clasificación electrofisiológica e histológica de la enfermedad de CMT.	3
2.2. Aspectos genéticos de la enfermedad de CMT.....	4
2.3. Aspectos clínicos de la enfermedad de CMT.....	7
3. Genética y biología de las formas desmielinizantes de Charcot-Marie-Tooth	10
3.1. Componentes estructurales de la mielina: PMP22, MPZ, PRX y Cx32.	11
3.2. EGR2/Krox20, factor de transcripción	13
3.3. Componentes de las rutas endocíticas y señalización celular relacionados con la neuropatía de CMT.....	13
3.4. <i>GDAP1</i> , componente mitocondrial	15
3.5. Otras proteínas en CMT desmielinizante.....	15
4. Charcot-Marie-Tooth tipo 4C	17
4.1. <i>SH3TC2</i> , gen implicado en la enfermedad de CMT4C.....	17
4.2. Genética y biología de SH3TC2	18
5. Los nervios periféricos.....	22
5.1. Biología del nervio periférico.....	22

Índice

5.2. Desarrollo de la mielina	23
6. La ruta de señalización Nrg1/ErbB	26
6.1. Nrg1 y los receptores ErbB2 y ErbB3.....	26
6.2. Endocitosis y tráfico intracelular de los receptores ErbB	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
Hipótesis.....	37
Objetivos.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Vectores de clonación y de expresión en células de mamífero	43
2. Clonaciones y subclonaciones.....	43
2.1. Clonación del cDNA humano de SH3TC2	44
2.2. Subclonaciones y mutagénesis dirigida.....	46
3. Material biológico y condiciones de crecimiento	48
3.1. Cepas bacterianas.....	48
3.2. Cultivos de líneas celulares inmortalizadas.....	48
4. Inmunofluorescencia en células en cultivo	50
4.1. Tratamiento de células con óxido de fenilarsina	51
4.2. Estudio de la internalización de ErbB2 y su asociación con SH3TC2	52
5. Preparación de fracciones subcelulares.....	53
5.1. Estudio del grado de asociación de SH3TC2 con las membranas celulares	53
5.2. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa.....	54

5.3. Purificación de <i>lipid rafts</i>	56
6. Análisis de proteínas.....	57
6.1. Obtención de extractos proteicos.....	57
6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección mediante <i>Western Blot</i>	57
7. Análisis de RNA	59
7.1. Retrotranscripción y análisis de expresión de RNA total	59
7.2. PCR cuantitativa a tiempo real	59
8. Mantenimiento de ratones de experimentación	60
9. Extracción y procesamiento de nervio ciático de ratón	60
9.1. Preparación de extractos proteicos de nervio ciático.....	61
9.2. Análisis de microscopía electrónica	61
10. Ensayos de biotilación.....	62
10.1. Ensayo de internalización.....	62
11. Análisis estadísticos	63
RESULTADOS.....	65
CAPÍTULO I.....	67
1. Expresión tisular y celular de <i>SH3TC2</i>	69
2. Clonación de <i>SH3TC2</i>	69
3. Localización celular de <i>SH3TC2</i>	71

Índice

4. SH3TC2 sufre una N-miristoilación para anclarse a las membranas celulares	72
5. SH3TC2 colocaliza con componentes de la ruta endocítica.....	75
6. Asociación de SH3TC2 con las membranas celulares	79
7. Función biológica de los dominios SH3 y TPR.....	81
8. Estudio de mutaciones descritas en pacientes afectados de CMT4C...	84
CAPÍTULO II.....	89
1. Expresión temporal de <i>Sh3tc2</i> en nervio ciático de ratón	91
2. Los ratones <i>Sh3tc2</i> ^{-/-} presentan un fenotipo hipomielinizante con aparición muy temprana	92
3. La ruta de señalización Nrg1/ErbB está alterada en ratones <i>Sh3tc2</i> ^{-/-} .	93
4. SH3TC2 colocaliza con el receptor ErbB2 en la membrana plasmática	95
5. SH3TC2 podría estar involucrada en el proceso de internalización de ErbB2	96
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXOS.....	163

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- BSA:** albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumine*)
CHC: cadena pesada de clatrina (*Clatrin-heavy-chain*)
CtxB: subunidad B de la toxina colérica (*Cholera toxin B subunit*)
EEA1: antígeno 1 del endosoma temprano (*Early endosome antigen 1*)
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growing factor receptor*)
FAK: quinasa de adhesión focal (*focal adhesión kinase*)
FBS: suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*)
GFP: proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)
GPCR: receptor acoplado a la proteína G (*G-protein coupled receptor*)
GPI: glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol*)
GRP-94: proteína regulada por la glucosa de 94 kDa (*Glucose-regulated protein of 94 kDa*)
GTP: guanosina trifosfato (*guanosine triphosphate*)
IMAGE: *The I.M.A.G.E Consortium*
KO mice: ratones deficientes (*Knock-out*)
LAMP1: proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (*Lysosomal-associated membrane protein 1*)
LDLR: receptor de lipoproteína de baja densidad (*low-density-lipoprotein-receptor*)
M6PR: receptor manosa-6-fosfato (*Mannose-6-phosphate receptor*)
NGS: secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*)
Nrg1: neuregulina-1 (*Neuregulin-1*)
ORF: pauta de lectura abierta (*Open reading frame*)
PAO: óxido de fenilarsina (*Phenylarsine oxide*)
PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase chain reaction*)
PI3: fosfoinositido-3 (*phosphoinositide-3*)
PMP70: proteína de membrana peroxisomal 70 (*Peroxisomal membrane protein 70*)
RTK: receptor tirosina quinasa (*Receptor tyrosine kinase*)
SCP: precursor de la célula de Schwann (*Schwann Cell Precursor*)
SDS: dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulphate*)
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (*SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
TCA: ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*)
Tfr: receptor de la transferrina (*Transferrin receptor*)
VCN: Velocidad Conducción Nerviosa
WT mice: ratones silvestres (*Wild-type*)

INTRODUCCIÓN

1. Neuropatías sensitivo-motoras hereditarias

El sistema nervioso es un sistema extraordinariamente complejo de comunicaciones, capaz de enviar y recibir una cantidad enorme de información simultáneamente. Este sistema es vulnerable a las lesiones y a las enfermedades. Las neuropatías periféricas hereditarias son un conjunto complejo de enfermedades, clínica y genéticamente heterogéneo, que producen una degeneración progresiva de los nervios periféricos. Además, constituyen uno de los grupos de enfermedades mendelianas más frecuentes.

En función de las clases de neuronas o axones afectados, las neuropatías hereditarias se clasifican en: neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH) si la debilidad muscular es predominante y está asociada tanto a una deficiencia sensorial como motora; en neuropatías motoras hereditarias (NMH) si la deficiencia motora es la predominante; neuropatías sensitivas hereditarias (NSH) si la deficiencia es solamente sensorial; neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH) si las deficiencias y/o disfunciones autonómicas predominan en la enfermedad.

En el grupo de las NSMH se pueden distinguir varias formas, que se diferencian principalmente por su semiología clínica: la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), el síndrome de Déjérine-Sottas (DS), la neuropatía hipomielinizante congénita (NHC) y la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión (NHPP).

1.1. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el trastorno neuromuscular hereditario más frecuente. CMT se caracteriza por su amplia heterogenidad genética (**Tabla 1**). La enfermedad debuta durante la primera o segunda décadas de la vida, y los pacientes suelen cursar con atrofia muscular distal progresiva en las piernas, arreflexia,

deformidades en los pies, y marcha de tipo equina. Con la progresión de la enfermedad las manos y los antebrazos se ven también afectados.

1.2. Síndrome de Déjérine-Sottas

La enfermedad de Déjérine-Sottas (DS) se asocia en muchos casos a mutaciones de genes que también están implicados en CMT: *PMP22*, *MPZ*, *EGR2*, *NEFL*, *PRX*, *Cx32* y *MTMR2*. Es una entidad clínicamente diferenciable, caracterizada por lesiones graves de las neuronas motoras, y acompañada por un retraso importante en el desarrollo motor. Las características neurofisiológicas [velocidad de conducción nerviosa (VCN) <10 m/s], los datos clínicos e histopatológicos (formaciones desmielinizantes con aspecto tipo bulbo de cebolla) son muy similares a las de CMT, si bien más agresiva.

1.3. Neuropatía hipomielinizante congénita

La neuropatía hipomielinizante congénita (NHC) se asocia también a genes implicados en CMT: *PMP22*, *MPZ*, *EGR2*, y *PRX*. Presenta un cuadro clínico similar a DS, pero manifiesta una marcada hipotonía neonatal/infantil. Histológicamente, se caracteriza por la presencia de fibras hipomielinizantes o amielinizantes, causado por un defecto en la fase de desarrollo. Esta observación la distingue del síndrome de DS que es desmielinizante.

1.4. Neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión

La deleción de 1,4 Mb en el *locus* CMT1A (cromosoma 17p11.2) es la causa más frecuente de la neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión (NHPP). Esta deleción afecta al gen *PMP22*. Se caracteriza por presentar una disfunción de la percepción o episodios de parestia asimétrica después de una mínima compresión o trauma sobre los nervios. Con la edad los pacientes pueden presentar aspectos clínicos similares a los característicos de CMT. Una característica histopatológica

de esta enfermedad es el engordamiento tipo salsicha de la mielina (tomácula).

2. Características de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

Más de 120 años han pasado desde que se describió la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, nombrada así por los tres científicos que la definieron, Charcot y Marie en París (1886) y Tooth en Londres (1886). CMT presenta una prevalencia estimada de 28 cada 100,000 individuos (Skre, 1974, Combarros et al., 1987). Debido a su heterogeneidad clínico-genética, ha sido necesario un gran esfuerzo para determinar cuál es el correcto protocolo a seguir para un buen diagnóstico. Actualmente, la mayoría de pacientes que presentan un fenotipo CMT pueden recibir un diagnóstico genético-molecular preciso. Sin embargo, el listado de genes implicados en las distintas formas de CMT no cesa de aumentar, lo que complica los procedimientos de diagnóstico, un reto que podría resolverse con las nuevas técnicas de ultrasecuenciación (NGS, *Next Generation Sequencing*): secuenciación del exoma (Montenegro et al., 2011); y secuenciación completa del genoma (Lupski et al., 2010, Zuchner, 2010).

2.1. Clasificación electrofisiológica e histológica de la enfermedad de CMT

Atendiendo a los estudios electrofisiológicos e histopatológicos, la enfermedad de CMT se puede clasificar en tres grupos principales: (i) desmielinizante o tipo 1 (CMT1), caracterizado por una VCN menor de 38 m/s y defectos primarios en la célula de Schwann con proliferación anómala de formaciones mielinizantes con aspecto de “bulbo de cebolla”; (ii) axonal o tipo 2 (CMT2), en la que la VCN se ve conservada o débilmente reducida (>38 m/s) y los defectos patológicos evidencian una degeneración crónica axonal; y (iii) una tercera forma intermedia (I-CMT), caracterizada histológicamente por tener un fenotipo mixto entre

CMT1 y CMT2, y con una VCN entre 30-40 m/s (Pareyson et al., 2006, Barisic et al., 2008).

2.2. Aspectos genéticos de la enfermedad de CMT

La enfermedad de CMT se puede clasificar también en función del patrón de herencia y en función de los genes o *loci* causantes la enfermedad (**Tabla 1**). CMT se segrega mediante todos los patrones de herencia mendelianos, autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR), y ligado al cromosoma X. Hasta la fecha, los más de 30 genes/loci involucrados en CMT, se relacionan con una amplia variedad de funciones, todos implicados en la biología del desarrollo y mantenimiento de los nervios periféricos (*Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database*, <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTmutations>) (Saporta et al., 2011) (**Tabla 1**). Éstos codifican para proteínas con diferentes localizaciones, incluyendo la mielina compacta y no compacta, las células de Schwann y el axón, y están implicadas en una gran variedad de funciones, desde la compactación y mantenimiento de la mielina hasta la formación del citoesqueleto, el transporte axonal, y el metabolismo de las mitocondrias (Barisic et al., 2008, Scherer and Wrabetz, 2008, Niemann et al., 2006).

Tabla 1. Formas de CMT, genes implicados, y localización y función de las proteínas

Tipo CMT	Gen	Localización y/o función de la proteína
CMT1: CMT desmielinizante autosómica dominante		
CMT1A	<i>PMP22</i>	Mielina compacta; mielinización
CMT1B	<i>MPZ/P0</i>	Mielina compacta; adhesión celular
CMT1C	<i>LITAF/SIMPLE</i>	Citoplasma; posible papel en la ruta de degradación proteica
CMT1D	<i>EGR2/Krox20</i>	Factor de transcripción involucrado en la regulación de genes de la mielina
CMT1E	<i>PMP22</i>	Mielina compacta; mielinización
CMT1F	<i>NEFL</i>	Citoesqueleto; organización de neurofilamentos
CMT2: CMT axonal autosómica dominante		
CMT2A1	<i>KIF1B</i>	Kinesina; transporte de mitocondrias
CMT2A2	<i>MFN2</i>	Mitocondria y ER; fusión de mitocondrias e interacción entre mitocondrias y ER
CMT2B	<i>RAB7</i>	Endosomas tardíos; tráfico vesicular
CMT2C	<i>TRPV4</i>	Potencial receptor transitorio vaniloide 4
CMT2D	<i>GARS</i>	Glicil-tRNA transferasa
CMT2E	<i>NEFL</i>	Citoesqueleto; organización de neurofilamentos
CMT2F	<i>HSPB1/HSP27</i>	Proteína de choque térmico
CMT2G	Desconocido	Desconocida
CMT2H	Desconocido	Desconocida
CMT2I	<i>MPZ/P0</i>	Mielina compacta; adhesión celular
CMT2J		
CMT2K	<i>GDAP1</i>	Mitocondria; dinámica mitocondrial
CMT2L	<i>HSPB8/HSP22</i>	Proteína de choque térmico
CMT2M	<i>DNM2</i>	GTPasa; fusión-fisión de membranas
CMT2N	<i>AARS</i>	Alanil-tRNA sintetasa
CMT intermedia dominante		
DI-CMTA	Desconocido	Desconocida
DI-CMTB	<i>DNM2</i>	GTPasa; fusión-fisión de membranas
DI-CMTC	<i>YARS</i>	Tirosil-tRNA sintetasa
DI-CMTD	<i>MPZ/P0</i>	Mielina compacta; adhesión celular
CMT intermedia recesiva		
RI-CMTA	<i>GDAP1</i>	Mitocondria; dinámica mitocondrial
RI-CMTB	<i>KARS</i>	Lisil-tRNA sintetasa

Tabla 1. Formas de CMT, genes implicados, y localización y función de las proteínas

Tipo de CMT	Gen	Localización y/o función de la proteína
CMT4: CMT desmielinizante autosómica recesiva		
CMT4A	<i>GDAP1</i>	Mitocondria; dinámica mitocondrial
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	Fosfatasa de PI3
CMT4B2	<i>SBF2/ MTMR13</i>	Implicada en señalización
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	Posible proteína adaptadora
CMT4D/HMSN-Lom	<i>NDGR1</i>	Posible función en diferenciación y en señalización celular
CMT4E	<i>EGR2</i>	Factor de transcripción involucrado en la regulación de genes de la mielina
CMT4F	<i>PRX</i>	Membrana de célula de Schwann; señalización extracelular
CMT4G/HMSN-Russe	<i>HK1</i>	Hexoquinasa
CMT4H	<i>FGD4</i>	Frabina; señalización Rho GTPasa
CMT4J	<i>FIG4</i>	Fosfatasa implicada en el tráfico vesicular y regulación de fosfoinosítoles
AR-CMT2/CMT4C: CMT axonal autosómica recesiva		
AR-CMT2A/CMT4C1	<i>LMNA</i>	Proteína estructural de la lamina nuclear
AR-CMT2B/CMT4C3	<i>MED25/ARC 92/AC1D1</i>	Subunidad 25 del complejo mediador de la transcripción por RNA polimerasa II
AR-CMT2K/CMT4C4	<i>GDAP1</i>	Mitocondria; dinámica mitocondrial
AR-CMT2C/CMT4C2	Desconocido	Desconocida
CMTX: CMT ligada al X		
CMTX1	<i>Cx32/GJB1</i>	Mielina no compacta; formación de <i>gap-junctions</i>
CMTX5	<i>PRSP1</i>	Fosfo-ribosil-pirofosfato sintetasa 1
Otras forma ligadas al X (CMTX2-CMTX4)	Desconocido	Desconocida

CMT1A es la forma más frecuente de CMT, afectando alrededor del 60-90% de los pacientes CMT1, y en torno al 40-50% de todos los pacientes CMT. Esta forma está causada principalmente por una duplicación de 1,4 Mb en la región cromosómica 17p11.2, que contiene el gen *PMP22* (*peripheral myelin protein 22*). Además, CMT1A puede ser

debido a mutaciones puntuales en *PMP22*. Otras formas relativamente frecuentes son CMT1B causada por mutaciones en el gen *MPZ* (*myelin protein zero*), y CMTX1 debida a mutaciones en el gen *Cx32* (*Connexin 32*) (Szigeti and Lupski, 2009, Nelis et al., 1996, Szigeti et al., 2006, Boerkoel et al., 2002).

CMT2 presenta una alta heterogeneidad genética y no hay un gen cuya prevalencia destaque especialmente. En muchas series, *MFN2* (*mitofusin 2*), se señala como el gen más frecuentemente implicado en esta forma de CMT, seguido de *MPZ*, y del *NEFL* (*Neurofilament Light Chain*) (Barisic et al., 2008, Pareyson, 2007, Szigeti et al., 2006, Verhoeven et al., 2006).

Las formas AR son menos comunes que las AD excepto en el área mediterránea y en poblaciones con alta tasa de consanguinidad. Clínicamente, son más graves que las dominantes, y pueden ser tanto axonales (AR-CMT2) como desmielinizantes (CMT4). El gen *GDAP1* (*ganglioside-induced differentiated-associated protein-1*), asociado a CMT4A y sus variantes alélicas CMT2K y AR-CMT2K, y el gen *SH3TC2* (*Src homology 3 and tetratricopeptide repeat*), asociado a CMT4C, representan las formas más frecuentes. Hoy en día, la frecuencia de mutaciones encontradas en *SH3TC2* en pacientes tanto de población europea como no europea, hace que CMT4C represente la forma autosómica recesiva desmielinizante más común en varias poblaciones (Gosselin et al., 2008, Houlden et al., 2009, Lassuthova et al., 2011). En España, CMT4C representa la forma más frecuente de CMT en etnia gitana (Claramunt et al., 2007).

2.3. Aspectos clínicos de la enfermedad de CMT

Como se ha mencionado anteriormente, las características clínicas de CMT cursan con una debilidad muscular distal progresiva y atrofia, empezando en las extremidades inferiores y posteriormente afectando también las extremidades superiores. CMT representa un grupo de

Introducción

entidades clínicamente heterogéneas, con un amplio rango de variabilidad en la edad de aparición, fisiopatología y gravedad de la enfermedad, tanto intra como interfamiliar (García, 1999, Lupski, 2000, Gooding et al., 2005), llegando a describirse variabilidad incluso entre gemelos (Dyck et al., 1993, Adams et al., 1999). Independientemente del tipo de defecto estructural o metabólico primario que afecta a la mielina o al axón, finalmente se desencadena un proceso axonal degenerativo (Pareyson et al., 2006). La marcha de tipo equina, las deformidades en los pies (escoliosis, pies cavos, dedos en martillo, manos en garra), la pérdida sensorial distal, y la disminución o ausencia de los reflejos tendíneos son síntomas característicos de esta enfermedad (**Fig. 1**) (Harding and Thomas, 1980, Berciano et al., 2011). Estas manifestaciones debutan generalmente en la primera o en la segunda década de vida.

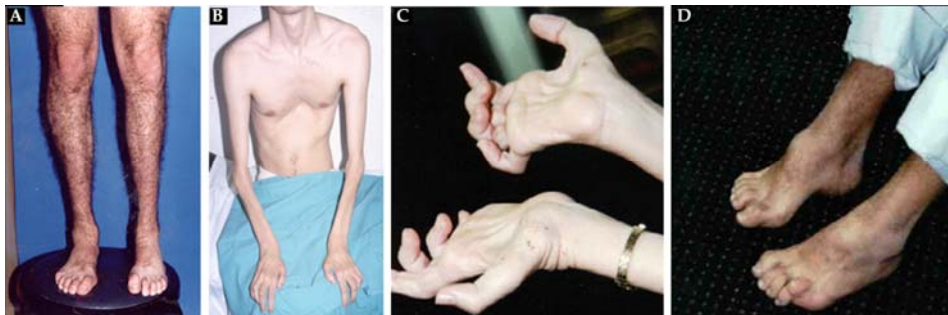


Fig. 1. Representación de los signos clínicos característicos de CMT. (A) Atrofia muscular peroneal, delgadez del tobillo (aspecto de la pierna tipo “botella invertida”). **(B)** Atrofia muscular de los brazos. **(C)** Manos en garra. **(D)** Pie cavo, dedos en martillo.

En primer lugar, se afectan las piernas, produciéndose una atrofia distal de las extremidades inferiores que se puede reflejar en el aspecto de botella invertida que adquieren las piernas (**Fig. 1A**). Conforme la enfermedad avanza, las extremidades superiores (brazos y manos) se ven afectadas (**Fig. 1B-C**). Los síntomas sensitivos son menos frecuentes, aunque la sensibilidad táctil y vibratoria está afectada, y en algunos casos se causa dolor. Los reflejos tendíneos están reducidos o completamente ausentes y siguen el mismo gradiente de progresión distal-proximal. En

algunos casos de CMT los pacientes pueden presentar otras manifestaciones adicionales como paraplejia espástica, sordera, retraso mental o disfonía. Los pacientes de CMT requieren una monitorización periódica, y la fisioterapia puede mejorar la calidad de vida de los enfermos (Njegovan et al., 1997, Lindeman et al., 1999). También ayudan la aplicación de dispositivos ortopédicos y las intervenciones quirúrgicas (Mann and Hsu, 1992, Guyton and Mann, 2000). Aproximaciones terapéuticas con ácido ascórbico y onapristona (antagonista de la progesterona) parecen normalizar la dosis en la duplicación presente en modelos animales de CMT1A (Sereda et al., 2003, Passage et al., 2004, Meyer zu Horste et al., 2007). La mejora en el modelo murino de CMT1A tras tratamiento con ácido ascórbico, ha posibilitado la realización de ensayos clínicos en pacientes, si bien con resultados negativos (Burns et al., 2009, Micallef et al., 2009, Verhamme et al., 2009, Pareyson et al., 2011).

3. Genética y biología de las formas desmielinizantes de Charcot-Marie-Tooth

Las formas desmielinizantes son las formas más frecuentes de CMT (Saporta et al., 2011). Las células de Schwann expresan cada uno de los genes que causan las neuropatías desmielinizantes. Las proteínas codificadas por estos genes presentan localizaciones celulares diferentes relacionadas con los procesos bioquímicos en los cuales están implicadas (Fig. 2).

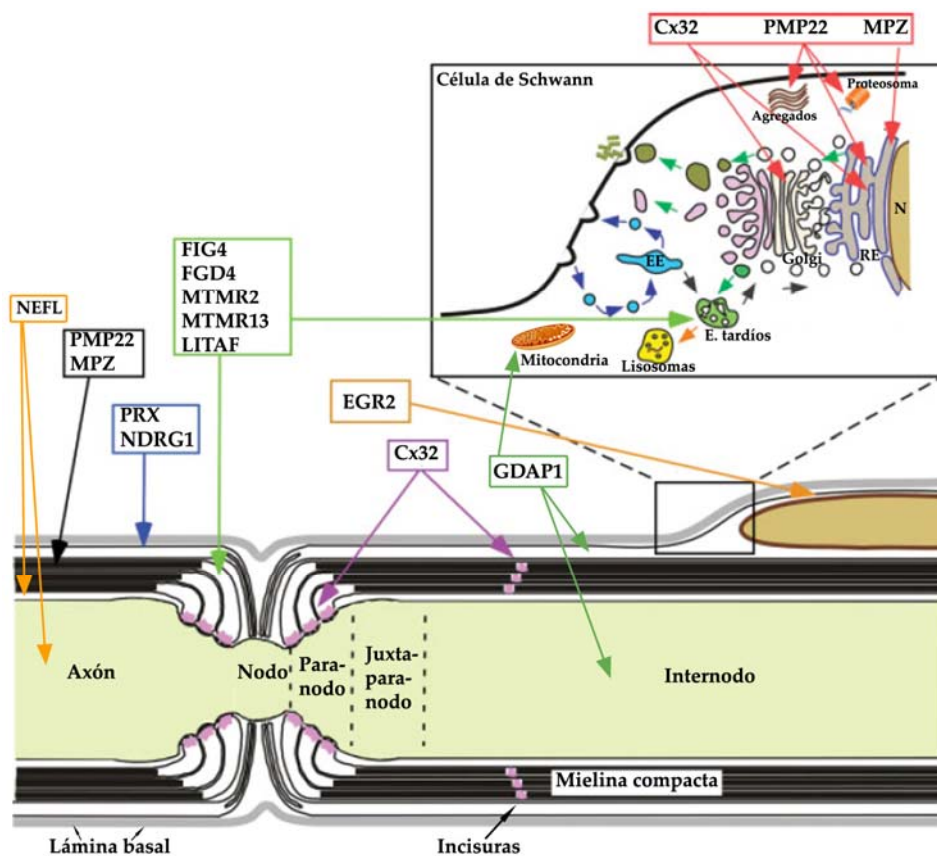


Fig. 2. Esquema representativo de un axón mielinizado y de la localización de las proteínas mutadas en las formas desmielinizantes de CMT. Adaptado de Scherer *et al.* (2008).

Análisis funcionales *in vitro*, y experimentos con modelos animales han sido muy útiles para entender el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad. Estos estudios, han ayudado a descifrar las rutas bioquímicas implicadas en la biología de los nervios periféricos, y a mejorar la clasificación de la enfermedad de CMT en función de la biología de cada uno de los genes y las respectivas proteínas implicadas.

3.1. Componentes estructurales de la mielina: PMP22, MPZ, PRX y Cx32.

La vaina de mielina es una membrana celular especializada en capas, que envuelve el segmento de un axón, facilitando la conducción saltatoria a nivel de las membranas internodales del axón. También facilita el agrupamiento de los canales iónicos a nivel de los nodos de Ranvier. Los procesos de desmielinización desorganizan los canales iónicos en la región nodal y alteran la capacitancia del axón, provocando así un bloqueo o una disminución de la conducción (Smith et al., 2005, Waxman et al., 1995). Los genes *PMP22*, *MPZ*, *PRX* y *Cx32* codifican para proteínas estructurales de la mielina, por lo tanto un defecto en éstas conllevaría a la formación de una mielina anómala, y consecuentemente la conducción nerviosa se vería afectada.

PMP22 es una proteína de membrana que forma parte de la mielina compacta de los nervios periféricos, y un aumento de su cantidad provoca un proceso de desmielinización (Gabreels-Festen et al., 1992). La duplicación de un fragmento de 1,4 Mb que afecta el gen *PMP22* es la causa principal de la forma CMT1A mientras que la delección del mismo está asociada con NHPP (Raeymaekers et al., 1991, Lupski, 1997, Adlkofer et al., 1997). El mecanismo fisiopatológico responsable de estas dos mutaciones está relacionado con la idea de una acción dependiente de la dosis génica de *PMP22* (Lupski et al., 1992). Mutaciones puntuales en el gen *PMP22* pueden causar tanto NHPP como CMT, e incluso DS.

MPZ es la proteína más abundante de la mielina, y por ser una proteína de adhesión celular, conecta las distintas capas de mielina, desempeñando un papel fundamental en su compactación (Giese et al., 1992, Martini et al., 1995, Martini and Schachner, 1997, Yin et al., 2000). Las más de 100 mutaciones conocidas hasta la fecha, se han descrito como responsables tanto de la forma CMT1B y CMT2I, como también de formas con fenotipo clínico muy severo (DS o NHC) (Shy et al., 2004).

PRX (Periaxin), mutaciones en este gen se transmiten de forma recesiva y pueden causar un amplio espectro de neuropatías desmielinizantes (Boerkoel et al., 2001, Takashima et al., 2002). Los pacientes portadores de mutaciones en el gen *PRX* pueden manifestar síntomas de CMT4F o DS. La proteína *PRX* contiene un dominio PDZ, que interacciona con proteínas de la membrana plasmática y del citoesqueleto. Su función está relacionada con la estabilización de la mielina en el sistema nervioso periférico, de modo que *PRX* podría jugar un papel importante en la estabilización de la unidad célula de Schwann-axon (Gillespie et al., 2000). Los ratones KO de *PRX* desarrollan fibras gruesas de mielina. La estructura alterada en estos ratones parece ser inestable dado que el plegamiento de la mielina y los procesos extensivos de desmielinización son características comunes en el sistema nervioso periférico de animales más viejos (Gillespie et al., 2000).

Cx32 está asociada a las formas dominantes (CMTX1). Su proteína se localiza en las incisuras de Schmidt-Lantermann, *loops* paranodales, y en la zona internodal de la compactación parcial de la mielina (Meier et al., 2004). *Cx32* regula los poros que permiten el transporte de moléculas a través de las *gap junctions*. Mutaciones en esta proteína causan desmielinización debido a una ineficiencia en el transporte entre capas de mielina. Se ha demostrado, en ratones transgénicos, que el defecto inicial causante de la enfermedad ocurre en la mielinización, y que la pérdida axonal es secundaria (Scherer et al., 2005).

3.2. EGR2/Krox20, factor de transcripción

Debido a que los genes de la mielina están altamente regulados, es lógico suponer que los factores de transcripción son candidatos potenciales que podrían estar implicados en las neuropatías periféricas.

El factor de transcripción *EGR2/Krox20* (*early growth response gene-2*) es responsable de la forma autonómica recesiva CMT4E. Mutaciones en este gen están también asociadas con una forma autosómica dominante de CMT (CMT1D) y con la neuropatía de DS. El gen *EGR2* codifica para un factor de transcripción que contiene dominios de zinc (Topilko et al., 1994). Los genes diana de *EGR2/Krox20* codifican para varias proteínas de la mielina como son MPZ, PMP22, Cx32, y PRX, cuyas mutaciones son también responsables de formas de CMT, y también de genes implicados en la biosíntesis del colesterol (Nagarajan et al., 2001, Le et al., 2005, Leblanc et al., 2005, LeBlanc et al., 2007). Estudios en diferentes ratones mutantes de *Eg2r*, han confirmado la importancia fundamental de *EGR2* para el desarrollo y mantenimiento de la mielina de los nervios periféricos (Topilko et al., 1994, Le et al., 2005, Decker et al., 2006).

3.3. Componentes de las rutas endocíticas y señalización celular relacionados con la neuropatía de CMT.

El equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes estructurales y de señalización, es crucial para el correcto mantenimiento de los compartimientos membranosos de las células de Schwann mielinizante. La endocitosis y el reciclaje de las proteínas de membrana también regulan el mantenimiento de estos compartimientos y sobre todo juegan un papel fundamental en la maquinaria molecular de la célula de Schwann. Varias proteínas implicadas en estos procesos de regulación están relacionadas con CMT. Además, algunos autores enfatizan la importancia de las fosfatasa de fosfoinositoles (PIP) y la

señalización de las pequeñas rhoGTPasas en la mielinización (Suter, 2007, Niemann et al., 2006).

Mutaciones recesivas en el gen *MTMR2* (*myotubularin-related 2*) y *MTMR13/SBF2* (*myotubularin-related 13/set-binding factor 2*) causan CMT4B1 y CMT4B2, respectivamente. Estas proteínas son las primeras moléculas de señalización celular descritas en neuropatías hereditarias (Bolino et al., 2000, Azzedine et al., 2003, Senderek et al., 2003b). Sólo *MTMR2* es catalíticamente activa como fosfatasa, aunque para su función correcta necesita a *MTMR13*, con la que forma un tetrámero. La actividad dual fosfatasa sobre PI(3)P o PI(3,5)P2 parece estar relacionada con el proceso de fusión de vacuolas (Berger et al., 2002, Berger et al., 2006). Estudios en ratones mutantes de *Mtmr2* y *Mtmr13* confirman que la desmielinización es causada por una pérdida de función (Bolino et al., 2004, Bonneick et al., 2005, Tersar et al., 2007, Robinson et al., 2008).

CMT4J está causada por mutaciones en el gen *FIG4*. *FIG4* es una fosfatasa que se localiza en la membrana plasmática, y está implicada en la regulación del contenido de fosfoinosítoles y en el tráfico vesicular: *FIG4* defosforila PI(3,5)P2 e interactúa con *FAB1* y *VAC14* en un complejo proteico que regula la concentración de PI(3,5)P2 (Volpicelli-Daley and De Camilli, 2007). PI(3,5)P2 es un mediador del tráfico retrógrado de las vesículas de endosomas a la red del *trans*-Golgi (Rutherford et al., 2006, Zhang et al., 2007).

El gen *FGD4/FRABIN*, está involucrado en la enfermedad CMT4H y codifica para una Rho GTPasa ubicua (Stendel et al., 2007). En eucariotas, las Rho-GTPasas desempeñan un papel importante en la regulación de las rutas de señalización. *FGD4* contiene un dominio FYVE y dos dominios PH, que se unen a los fosfoinosítoles (Delague et al., 2007, Stendel et al., 2007). La reducción de los niveles de proteína en ratas post-natales y adultas, sugiere una mayor implicación de *FGD4* en la fase temprana de desarrollo de la mielina.

Mutaciones en *LITAF* (*Lps-Induced TNF-Alpha-Factor*) causan CMT1C. *LITAF* colocaliza parcialmente con los dominios WW de la oxireductasa en el Golgi y con LAMP-1 en los lisosomas, y participa en la degradación de proteínas (Moriwaki et al., 2001, Ludes-Meyers et al., 2004). Un defecto de la función de *LITAF* en el tráfico endosomal o en la actividad lisosomal podría aumentar el efecto de acumulación de PMP22 resultando en una desmielinización severa (Ryan et al., 2002, Bennett et al., 2004, Saifi et al., 2005).

3.4. *GDAP1*, componente mitocondrial

Mutaciones en el gen *GDAP1* son responsables tanto de la forma desmielinizante, CMT4A, como de las axonales, AR-CMT2K (Baxter et al., 2002, Cuesta et al., 2002, Nelis et al., 2002) y CMT2K, e incluso de una forma intermedia: RI-CMTA. *GDAP1* se expresa tanto en la célula de Schwann como en las neuronas (Baxter et al., 2002, Cuesta et al., 2002), se localiza en la membrana externa mitocondrial (Niemann et al., 2005, Pedrola et al., 2005), y se relaciona con procesos de dinámica mitocondrial (Niemann et al., 2005). Las mutaciones recesivas parecen causar una pérdida de función de la actividad de fisión mitocondrial, mientras que las mutaciones dominantes podrían afectar la fusión mitocondrial dado que provocan un proceso de agregación de las mitocondrias (Wagner et al., 2009).

3.5. Otras proteínas en CMT desmielinizante

CMT1F está causado por mutaciones en el gen *NEFL* (*Neurofilament Light Chain*). *NEFL* es importante para la organización de los neurofilamentos y el transporte axonal. Mutaciones en *NEFL* son también causas de una forma axonal (CMT2E) (Mersiyanova et al., 2000).

CMT4D está causada mayoritariamente por la mutación fundadora p.R148X en el gen *NDRG1* (*N-myc-downstream-regulated-gene 1*) (Kalaydjieva et al., 1996), descrita exclusivamente en población gitana.

Introducción

Hasta la fecha sólo otra mutación se ha descrito y en un solo paciente (Hunter et al., 2003). NDRG1 juega un papel principal en la diferenciación celular (Kalaydjieva et al., 2000).

CMT4G, otra forma recesiva desmielinizante está asociada a una única mutación descrita en población gitana, en el gen *HK1* (*Hexokinase 1*) (Hantke et al., 2009).

CMT4C está asociada a mutaciones en el gen *SH3TC2* (Senderek et al., 2003a). Las mutaciones se transmiten con una herencia autosómica recesiva. *SH3TC2* codifica para una proteína que contienen dominios SH3 y TPR, sugiriendo una posible implicación en la formación de complejos multiproteicos. *SH3TC2* está altamente conservada en los vertebrados y se expresa principalmente en tejidos neuronales (Senderek et al., 2003a).

4. Charcot-Marie-Tooth tipo 4C

4.1. *SH3TC2*, gen implicado en la enfermedad CMT4C

CMT4C es una forma de CMT desmielinizante con herencia autosómica recesiva. Esta variante se cartografió en el *locus* 5q23-q33 en dos familias algerinas consanguíneas (LeGuern et al., 1996). Las biopsias de nervio sural de pacientes de CMT4C muestran una pérdida evidente de fibras, y la mitad de ellas presentaba un engrosamiento focal de la mielina. Además, se observan procesos anómalos de la membrana basal, que generan formaciones atípicas tipo “bulbos de cebolla”, las cuales rodean axones desmielinizados y remielinizados (**Fig. 3**).

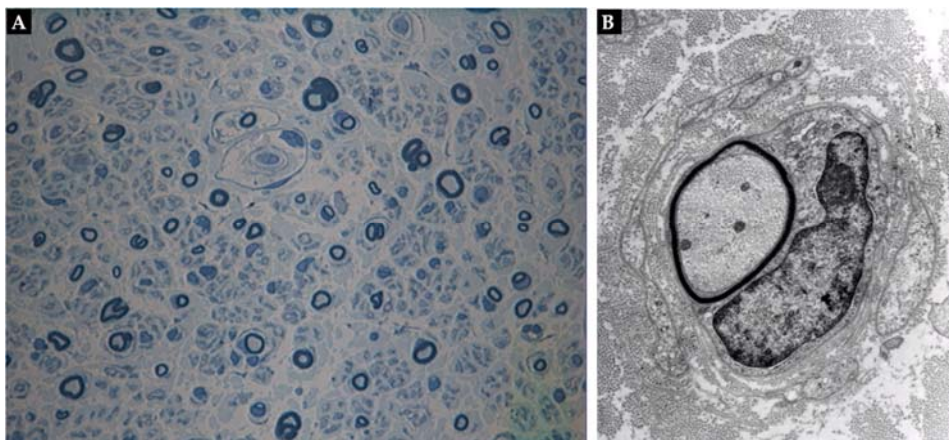


Fig. 3: (A) Sección semifina de nervio sural de un paciente de CMT4C. Se denota una marcada pérdida de fibras mielínicas y algunas representaciones de proliferación de célula de Schwann con formación de bulbos de cebolla. (B) Imagen tomada mediante microscopía electrónica en sección ultrafina de nervio sural, que muestra el aspecto tipo bulbos de cebolla que la célula de Schwann forma alrededor del axón. Imágenes cedidas por el Dr. Juan Vilchez.

Posteriormente se describió también un patrón de células de Schwann con formaciones citoplasmáticas extensas y largas (Gabreels-Festen et al., 1999, Senderek et al., 2003a, Gooding et al., 2005). En 2003, Senderek *et al* identificaron 11 mutaciones en el gen *KIAA1985/SH3TC2* (Senderek et al., 2003a).

Clínicamente, los primeros síntomas de CMT4C debutan con una aparición temprana de deformidades en el esqueleto (principalmente escoliosis, y pies cavos) (**Fig. 1**), que precede a una deficiencia motora y sensitiva. La deficiencia motora es relativamente débil y existe una moderada disminución de la VCN con un rango variable entre 4-37 m/s, y una media de 22 m/s. Los síntomas neurológicos parecen variar en cada familia y en algunos casos pueden cursar con pérdida de deambulación y con problemas respiratorios. Se han descrito también casos de pacientes con manifestaciones clínicas adicionales tales como sordera, nistagmo y debilidad de la zona facial (Houlden et al., 2009, Lassuthova et al., 2011).

4.2. Genética y biología de SH3TC2

El gen *SH3TC2* humano abarca 62 kb de la secuencia de DNA genómico, y contiene 18 exones codificantes. La ORF más larga es de 3.867 pb y se genera a partir de 17 exones (**Fig. 4A**). El gen *SH3TC2* puede dar lugar a distintos productos de *splicing* alternativo, que presentan similitud a algunos de los transcritos generados en pacientes con CMT4C que portan mutaciones que codificarían para proteínas truncadas. El *skipping* de los últimos 58 pb del exón 6 (exón 6s), la inserción de un exón de 130 pb entre los exones 8 y 9 (exón 8A), y la retención del intrón 10 han sido descritos como productos de *splicing* alternativo (Senderek et al., 2003a).

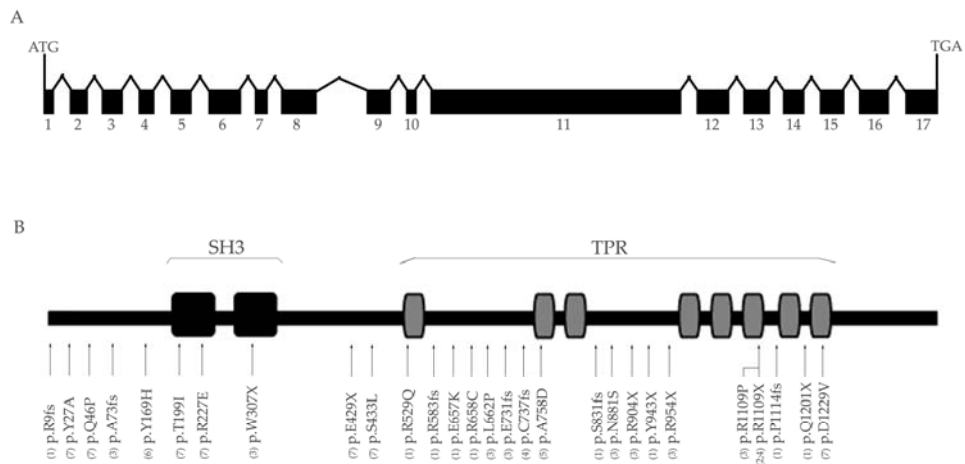


Fig. 4: (A) Esquema representativo del gen *SH3TC2*. Las líneas representan los intrones, mientras que los rectángulos representan los exones. (B) Esquema representativo de la proteína SH3TC2 y distribución de las mutaciones previamente descritas: (1) Senderek, 2003; (2) Gooding, 2005; (3) Asedien, 2006; (4) Claramunt, 2007; (5) Lupo, 2009; (6) Lupski, 2010; (7) Lassutova, 2011.

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 30 mutaciones distintas de *SH3TC2*, distribuidas a lo largo de todo el gen, en familias procedentes de diferentes países europeos, norteafricanos y también de EEUU y Canadá, y de diverso origen étnico (caucasianos gitanos y no gitanos). En la **figura 4B** se muestra la distribución de todas las mutaciones descritas a lo largo del producto génico de *SH3TC2*.

La mitad de estas mutaciones conducen a proteínas truncadas, es decir, a una pérdida de la función de la proteína tal y como es de esperar al tratarse de una enfermedad autosómica recesiva. En algunos casos, las proteínas truncadas pierden parte de los dominios TPR, como es el caso de la mutación p.R1109X, que conlleva la pérdida de 6 dominios TPR. Sin embargo otras mutaciones que provocan deleciones sólo del último dominio TPR, como es el caso de la p.Q1201X, son suficientes para causar la enfermedad.

En nuestro laboratorio, hemos descrito dos mutaciones de *SH3TC2*, p.R1109X y p.C737_P738delinsX, en una serie de familias españolas de etnia gitana, postulando un posible efecto fundador para la

mutación p.R1109X (Gooding et al., 2005, Claramunt et al., 2007). Los afectos de CMT4C muestran un amplio espectro de características clínicas, subrayando la marcada variabilidad inter- y intrafamiliar de esta forma de CMT (Gooding et al., 2005). Esta variabilidad se ha descrito en familias de otras poblaciones y en mutaciones distintas, remarcando aún más la dificultad en el establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo para CMT4C, al igual que sucede con otras enfermedades (Senderek et al., 2003a, Azzedine et al., 2006, Colomer et al., 2006, Gosselin et al., 2008, Gooding et al., 2005). En los últimos años, el testado de *SH3TC2* en el diagnóstico genético de pacientes con neuropatías desmielinizantes, ha ido ganando más interés debido a la alta frecuencia de esta forma tanto en la población europea como no europea (Azzedine et al., 2006, Houlden et al., 2009, Lupski et al., 2010, Lassuthova et al., 2011).

Aunque el gen *SH3TC2* se expresa principalmente en cerebro y médula espinal, y de forma leve en músculo estriado, el transcrito más largo, y quizás el fisiológicamente activo, se expresa en tejido neuronal periférico y principalmente en nervio ciático sugiriendo una implicación mayor en neuropatías periféricas desmielinizantes (Senderek et al., 2003a).

El gen *SH3TC2* humano codifica para una proteína de 1.288 aminoácidos, cuya función es desconocida. El análisis de la estructura secundaria de los residuos aminoacídicos mediante el uso de los programas *SMART* y *ScanProsite*, muestra la presencia de dominios N-terminales SH3 (*Src homology 3*, base de datos Pfam: PF00018) y varios dominios TPR (*tetratricopeptide repeat*, base de datos Pfam: PF00515). En la **figura 4B**, se ilustra la distribución de estos dominios a lo largo de la proteína, de acuerdo con la base de datos de *UniProt* (Q8TF17).

Los dominios SH3 son altamente conservados en eucariotas, procariotas y virus, y se pueden identificar en enzimas (tirosina quinasas, fosfolipasa $\gamma 1$ [PLC $\gamma 1$] y PLC $\gamma 2$, fosfoinositol 3-quinasa y el complejo

de la NADPH oxidasa), moléculas del citoesqueleto, y miosinas. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la comunicación entre células, y en los procesos de señalización desde la membrana plasmática hasta el núcleo (Whisstock and Lesk, 1999). Por otro lado, las proteínas con dominios TPR están implicadas en muchos procesos celulares mediante interacción con otras proteínas: en la mitosis y síntesis de RNA debido a su asociación en el control de complejos multiproteicos relacionados con el ciclo celular o con la maquinaria de transcripción, en transporte de proteínas, y en la regulación de la función de chaperonas (Blatch and Lassle, 1999, D'Andrea and Regan, 2003). La presencia de estos dominios sugiere una implicación de la proteína SH3TC2 en la formación de complejos multiproteicos y probablemente relacionados con la función de la célula de Schwann durante el desarrollo y mantenimiento de la mielina.

SH3TC2 está fuertemente conservada en los roedores, y especialmente en ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*), donde su ortólogo presenta una identidad aminoacídica del 81%. La proteína de ratón cuenta con 1.289 aminoácidos, mientras que la de rata tiene un aminoácido menos (1.288). La conservación de SH3TC2 en estos animales ha suscitado gran interés en la generación de organismos modelo para el estudio de la patogenia de CMT4C.

5. Los nervios periféricos

5.1. Biología del nervio periférico

La complicada arquitectura del sistema nervioso nos ayuda a entender que una mínima alteración en la expresión de un gen pueda llevar a la generación de múltiples neuropatías. El sistema nervioso consta básicamente de dos partes: el sistema nervioso central (CNS, *Central Nervous System*) y el sistema nervioso periférico (PNS, *Peripheral Nervous System*). Esta maquinaria tan compleja necesita una rápida conducción del impulso nervioso, que se hace posible mediante el desarrollo de células gliales que forman mielina, y que se denominan oligodendrocitos en el CNS o células de Schwann en el PNS. El PNS está constituido por haces paralelos de fibras nerviosas, denominados nervios periféricos, que pueden ser mielinizados o no mielinizados, y que están rodeados de vainas de tejido conectivo, que desde la más externa hacia la más interna se denominan: *epineurium*, *perineurium*, y *endoneurium* (Fig. 5).

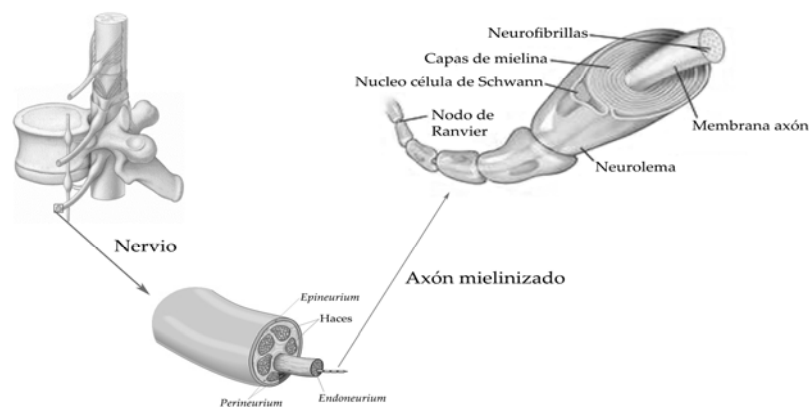


Fig. 5: Ilustración de la asociación entre una vértebra y la médula espinal. En detalle se ilustra la anatomía de un nervio periférico y de un axón mielinizado.

Los axones mielinizados están recubiertos de varias capas de mielina, compuestas principalmente por células de Schwann. Estas células son capaces de envolver los axones, de modo que la maquinaria responsable para la propagación del potencial de acción se concentra en sitios bien controlados y discontinuos a lo largo del axón, denominados “nodos de Ranvier” (Fig. 5).

La presencia de la mielina como un aislante internodal asegura que la despolarización de las membranas pueda ocurrir solamente a nivel de los nodos, dando así lugar a una conducción saltatoria nerviosa rápida. Los axones mielinizados y los nodos de Ranvier muestran una gran complejidad estructural y molecular. La vaina de mielina está formada por una región compacta que comprende varias proteínas estructurales, como son MPZ, PMP22 y MBP, y por una región no compacta que comunica con el axolema, constituido por proteínas como Caspr, contactina, Nfasc155, Nfasc186, ankyrina G, NrCAM, y también canales de sodio necesarios para la propagación del potencial de acción (Sherman and Brophy, 2005).

En el caso de las neuropatías desmielinizantes, se asume que el defecto primario se inicia en la célula de Schwann, causando una formación anómala o disminución de las capas de mielina, que posteriormente se traduce en una pérdida axonal. Consecuentemente, las alteraciones de la mielina afectarían principalmente la organización de los canales iónicos y el transporte axonal. Éste último defecto explicaría la degeneración axonal observada mayoritariamente a nivel distal de los nervios (Niemann et al., 2006).

5.2. Desarrollo de la mielina

Los mecanismos que inducen a la mielinización de un axón son muy complejos y empiezan en fase embrionaria. Durante el desarrollo de los nervios periféricos, las células de la cresta neural migran dando lugar a los precursores de las células de Schwann (SCP, *Schwann cell precursor*).

Las SCP se encuentran íntimamente en contacto con los haces de axones, proporcionan los factores tróficos para las neuronas, y son esenciales para la fasciculación de los nervios. Antes de su destino final, estas células pasan por una fase inmadura (células de Schwann inmaduras), y finalmente dan origen a dos poblaciones de células de Schwann maduras: mielinizantes y no-mielinizantes.

En los ratones, las SCP se forman en el estado embrionario de 12-13 días (E12-13), y desde E15-17 empiezan a dar lugar a las células de Schwann inmaduras. Si el destino de estas células es la mielinización, durante los primeros días de vida éstas se encuentran en una fase promielinizante, cuyo proceso de mielinización se completa tras un proceso lento que tarda varias semanas (Webster, 1971, Arroyo et al., 1998, Mirsky et al., 2002, Jessen and Mirsky, 2005). El destino de las células de Schwann parece depender del diámetro de los axones, sugiriendo que es el diámetro de los axones el que guía los procesos de mielinización (Friede, 1972, Voyvodic, 1989).

Todas estas fases están reguladas por múltiples factores (Jessen and Mirsky, 2005, Sherman and Brophy, 2005). Entre éstos, Nrg1 (*neuregulin 1*) es un factor de supervivencia esencial para las SCP en estado embrionario (Jessen and Mirsky, 2005), y está también implicada en la migración de las SCP durante el desarrollo del axón (Birchmeier, 2009). Durante la mielinización, la célula de Schwann aumenta enormemente su área membranal, cuya generación es determinada por la expresión de genes específicos de la mielina (Nagarajan et al., 2002, Verheijen et al., 2003). Los niveles de Nrg1 son importantes durante la fase temprana de desarrollo post-natal tanto para determinar el espesor de la vaina de mielina como para decidir si la célula de Schwann debe o no debe mielinizar al axón (Taveggia et al., 2005). Nrg1 resulta también imprescindible para el mantenimiento de la vaina de mielina en ratones adultos (Cohen et al., 1992, Chen et al., 1994).

En el sistema nervioso periférico, la señalización de Nrg1 es mediada por los receptores tirosina quinasa ErbB2 y ErbB3 (Lemke, 2006) (Fig. 6).

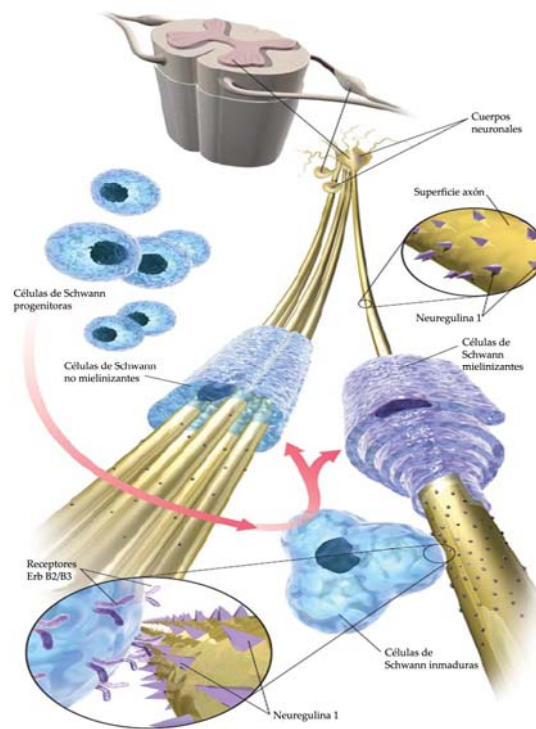


Fig. 6: Esquema representativo de los múltiples papeles de Nrg1 en el desarrollo de las células de Schwann. Tanto las células de Schwann progenitoras como las inmaduras requieren la presencia de Nrg1 en el axón, para la proliferación, supervivencia, y migración hacia los nervios periféricos. Imagen adaptada de Lemke (2006).

La evidencia de que Nrg1 es un factor limitante en la mielinización ha sido corroborada mediante varios estudios con animales mutantes de *ErbB2* o *ErbB3*, y *Nrg1* (Garratt et al., 2000, Riethmacher et al., 1997, Michailov et al., 2004, Taveggia et al., 2005). En conclusión, ErbB2 y ErbB3, juntos con el ligando Nrg1 constituyen la ruta Nrg1/ErbB, cuyo correcto funcionamiento es estrictamente necesario para una fisiología adecuada en los nervios periféricos.

6. La ruta de señalización Nrg1/ErbB

En la actualidad, uno de los grandes retos en la investigación del PNS es entender el mecanismo molecular que subyace en la comunicación entre la célula de Schwann y el axón. Esta interacción es crucial para la correcta organización y función de este sistema tan complejo. Hasta la fecha, la ruta Nrg1/ErbB emerge como un proceso de señalización fundamental para el control de las células de Schwann, no sólo durante el desarrollo, sino también durante el mantenimiento de la mielina.

6.1. Nrg1 y los receptores ErbB2 y ErbB3

Nrg1 forma parte de una familia de más de 15 proteínas asociadas a membranas o secretadas (Falls, 2003, Esper et al., 2006). Todas las isoformas de neuregulina comparten un dominio de señalización similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*). Las neuregulinas median también la interacción entre células en el corazón y en otros órganos. Estas proteínas señalizan mediante los receptores ErbB, miembros de la superfamilia de los receptores EGF (Citri et al., 2003). La célula de Schwann responde principalmente a la forma de Nrg1 tipo III, que junto a la Nrg1 tipo I son las formas más abundantes en los tejidos neuronales y gliales (Falls, 2003, Adlkofer and Lai, 2000).

ErbB2 y ErbB3 representan los receptores más relevantes en la célula de Schwann, y responden principalmente a la señal de Nrg1 tipo III (Michailov et al., 2004, Taveggia et al., 2005). ErbB2 tiene una actividad tirosina quinasa requerida para la señalización, y ErbB3 se une al ligando extracelular con una alta afinidad, aunque es catalíticamente inactivo (Citri et al., 2003).

La unión de Nrg1 induce la homo- y/o heterodimerización de los receptores ErbB2 y ErbB3, la activación y fosforilación de los residuos de tirosina, y el desencadenamiento de una secuencia compleja de

interacciones moleculares que resulta en el reclutamiento de moléculas adaptadoras que contienen dominios SH3. Posteriormente, se genera la activación de rutas de señalización intracelulares que incluye la estimulación o inhibición de la proliferación, la apoptosis, la migración, la diferenciación y la adhesión celular (**Fig. 7**) (Newbern and Birchmeier, 2010, Yarden and Sliwkowski, 2001).

En esta cascada de interacciones intracelulares están Grb2, Shc, Sos, PLC γ , PI3K, y Src, y de su interacción y/o fosforilación resulta la activación de cascadas de señalización canónicas, como son la PI3K/Akt, Ras/Erk1/2, PLC γ , y FAK, las cuales independientemente conducen a cambios en los procesos bioquímicos y en la expresión génica (Kim et al., 1997, Maurel and Salzer, 2000, Vartanian et al., 2000, Li et al., 2001, Ogata et al., 2004, Kao et al., 2009).

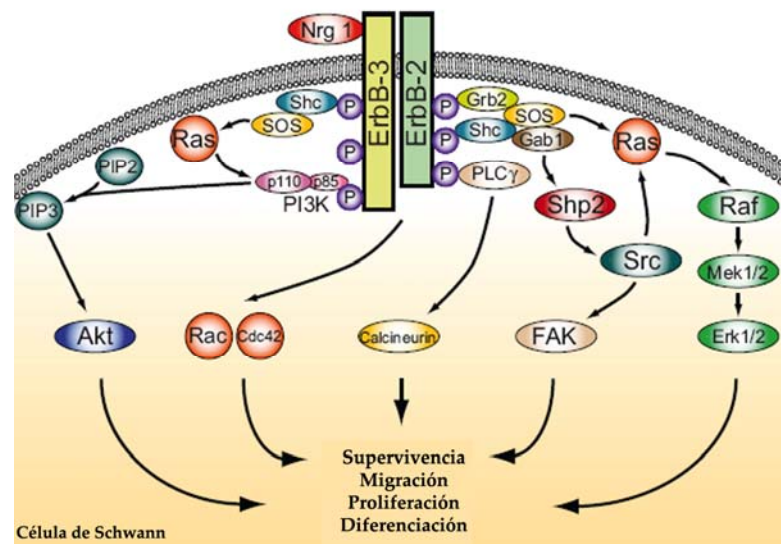


Fig. 7: Cascadas de señalizaciones activadas por la ruta Nrg1/ErbB. Adaptada de Newbern *et al.* (Newbern and Birchmeier, 2010).

La expresión génica que regula la diferenciación de la célula de Schwann, y que conlleva a la síntesis y mantenimiento de la mielina, está principalmente regulada por dos factores de transcripción: Krox20/Egr2 (Monuki et al., 1990, Bermingham et al., 1996, Jaegle et al., 1996, Zorick et al., 1996a) y SCIP (Oct-6/Tst-1) (Swiatek and Gridley, 1993, Topilko et al., 1994, Zorick et al., 1999). En la célula de Schwann, mientras que SCIP presenta un pico de expresión en fase temprana promielinizante, Krox20 destaca por estar relacionado con la fase de transición promielinizante-mielinizante y por coordinar la expresión de varias proteínas estructurales de la mielina. De hecho, una deficiencia de este factor en ratones KO provoca un bloqueo de las células de Schwann en fase promielinizante-mielinizante y una marcada reducción en los niveles de expresión de los genes específicos de la mielina, como por ejemplo *MPZ* (Topilko et al., 1994, Zorick et al., 1999). Consecuentemente, los nervios periféricos de ratones KO de Krox20 permanecen en un estado dismielinizante. En humanos, mutaciones en *EGR2/KROX20* son responsables de formas graves de CMT. Aunque la actividad de Krox20 está fuertemente relacionada con los primeros días de vida en el desarrollo de la mielina, su función es también relevante para el mantenimiento de la mielina (Decker et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que la cascada de señalización mediada por la calcineurina (**Fig. 7**) regula el desarrollo de las células de Schwann, actuando *downstream* del complejo Nrg1/ErbB para activar directamente Krox20 en fase promielinizante (Kao et al., 2009).

Por último, se debe mencionar que la ruta Nrg1/ErbB actúa también en cooperación con otras moléculas extracelulares para el control de la mielinización (Newbern and Birchmeier, 2010). En definitiva, la importancia crucial de la ruta Nrg1/ErbB en las células gliales y sus múltiples funciones durante el desarrollo de la mielina consolidan fuertemente la hipótesis de que cualquier alteración en esta ruta contribuiría a la generación de una neuropatía que afecta en primer lugar la mielina.

6.2. Endocitosis y tráfico intracelular de los receptores ErbB

La célula está continuamente intercambiando información con otras células y con su entorno extracelular. Para que eso se cumpla es necesario que ésta se transmita de forma ordenada y regulada, y el tráfico vesicular desempeña un papel fundamental en el cumplimiento de estos requisitos.

El tráfico vesicular es fundamental para la formación y el mantenimiento de los compartimentos celulares y se puede subdividir en dos grandes procesos generales intracelulares: la exocitosis y la endocitosis. Mientras que la exocitosis se refiere al transporte de las proteínas desde las vesículas citoplasmáticas hacia la membrana plasmática, la endocitosis representa la producción *de novo* de membranas internas en la doble capa lipídica de la membrana plasmática, de modo que las proteínas de membranas, los lípidos y los fluidos extracelulares sufren un proceso de internalización dentro de la célula. El control de ambos procesos hace que la composición de la célula esté estrictamente regulada. La invaginación estructural de la membrana plasmática puede ocurrir mediante un mecanismo dependiente de proteínas de recubierta como es la clatrina (“endocitosis dependiente de clatrina”), o bien mediante vesículas no recubiertas (“endocitosis independiente de clatrina”). La endocitosis mediada por clatrina está generalmente asociada a la internalización de una amplia gama de cargas, incluyendo los receptores de reciclaje constitutivos como Tfr, y LDLR, receptores tirosina quinasa como EGFR, canales iónicos, GPCR, moléculas de adhesión, y membranas de vesículas sinápticas (McPherson et al., 2001, Grant and Donaldson, 2009). La ruta independiente de clatrina está asociada a varios procesos de internalización, y la más caracterizada está mediada por las caveolas. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol, esfingolípidos, y proteínas de señalización, que además pueden acumular también proteínas de unión al colesterol en la cara

citoplasmática de las vesículas, denominadas caveolinas. La dinamina es una GTPasa que desempeña un papel crítico en los procesos de endocitosis dependientes y no dependientes de clatrina, regulando los mecanismos de fisión de las vesículas desde la membrana plasmática. Una vez que las moléculas internalizan, éstas llegan a los endosomas tempranos, vesículas intermedias a partir de donde las proteínas pueden ser recicladas hacia la superficie celular, o bien transportadas a los endosomas tardíos y lisosomas donde tiene lugar la degradación proteica. Los endosomas reciben también moléculas desde otras fuentes, incluyendo las rutas de biosíntesis y autofágicas. La ruta endocítica es diferente según la función y el destino de ésta, altamente regulada, y muestra especificidad por el cargo. Además, las vesículas de estas rutas son estructuras altamente dinámicas y pueden sufrir múltiples procesos de remodelamiento estructural (*sorting*, fusión y fisión). Existen también otros mecanismos de internalización, independientes tanto de clatrina como de caveolas (Conner and Schmid, 2003, Kirkham and Parton, 2005), como por ejemplo la internalización de la subunidad B de la toxina del cólera (CtxB) (Sandvig and van Deurs, 2002, Lencer and Saslowsky, 2005), o de las proteínas ancladas a GPI (Naslavsky et al., 2003).

La endocitosis regula muchos procesos de señalización mediante el control del número de receptores disponibles en la superficie celular. En paralelo, algunos procesos de señalización regulan la misma ruta endocítica. Además, varios eventos de señalización celular parecen ocurrir en las membranas endosomales (von Zastrow and Sorokin, 2007). En base a estudios de fraccionamiento subcelular de los componentes de señalización RTK, se postula la implicación de los endosomas durante los procesos de señalización (Di Guglielmo et al., 1994), aunque hoy en día esta hipótesis se ha generalizado a una amplia variedad de sistemas de señalización. Muchos receptores de señalización atraviesan la ruta endocítica de forma regulada, y mediada por las membranas endosomales, que están organizadas en dominios especializados

(Gruenberg, 2001). Las proteínas efectoras implicadas en las cascadas de señalización pueden ser activadas a partir de los endosomas, de forma independiente a la activación que se inicia a nivel de la membrana plasmática (Warren and Landgraf, 2006).

La señal generada por el factor de crecimiento Nrg1 obtiene una respuesta mediante la activación de los receptores ErbB2 y ErbB3. La activación de estos receptores conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras, y la formación de un complejo proteico hace que los receptores ErbB internalicen.

Yang y colaboradores (Yang et al., 2005), demostraron que la presencia de Nrg1 aumenta la internalización o endocitosis de los receptores ErbB, y que ésta es fundamental para la activación de las cascadas de señalización intracelulares. En este trabajo, los autores sugieren que la internalización de los receptores ErbB ocurre posteriormente a la heterodimerización y fosforilación de ambos receptores, aunque otros más bien sugieren que la internalización podría también ocurrir antes de su activación, y que sería en los endosomas donde los receptores se fosforilarían. Una vez ocurrida su internalización, los receptores ErbB pueden ser transportados al interior de los endosomas tempranos y dirigidos a cuerpos vesiculares, multi-vesiculares y endosomas tardíos para su degradación, o bien a endosomas de reciclaje. Mientras que EGFR y ErbB2 son preferentemente degradados, ErbB3 es mayoritariamente reciclado, sugiriendo que los receptores ErbB sufren rutas diferentes, mecanismo que en algunos casos puede servir para potenciar la respuesta de la señalización (Waterman et al., 1998). Dentro de esta familia de receptores, ErbB2 ha sido ampliamente estudiado por su fuerte implicación en cáncer, y por él se han descrito casi todos los mecanismos de internalización conocidos, dependientes e independientes tanto de clatrina como de caveolas (Barr et al., 2008).

Introducción

En cambio, en el PNS, aunque muchos estudios confirman el hecho de que la ruta Nrg1/ErbB es esencial en la comunicación entre axón y células de Schwann, y fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la mielina, muy poco se sabe sobre los mecanismos que regulan este proceso. Es de gran interés descubrir cuáles y cómo actúan las moléculas asociadas a este proceso, no sólo para entender mejor la fisiología de los nervios periféricos, sino también para descifrar los mecanismos patológicos que subyacen en las neuropatías.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1. SH3TC2 es una proteína que presenta dominios SH3 y TPR, que están relacionados con la formación de complejos multi-proteicos, y son característicos de proteínas adaptadoras implicadas en múltiples procesos celulares. Los hallazgos histopatológicos en cortes de nervio sural de pacientes de CMT4C muestran principalmente un defecto en la capacidad de la célula de Schwann para envolver los axones correctamente, lo que conduce a la formación de una mielina anómala o escasa. Así pues, postulamos que SH3TC2 es una proteína esencial para la fisiología de la célula de Schwann, en la que podría jugar un papel relacionado con el estricto intercambio de comunicaciones entre el axón y la célula de Schwann, que es crucial para el correcto desarrollo de los nervios periféricos.

2. Los ratones KO de *Sh3tc2* (*Sh3tc2*^{-/-}) presentan un fenotipo hipomielinizante fuertemente similar al observado en animales mutantes de Nrg1, ErbB2 y ErbB3, componentes imprescindibles para el desarrollo de la mielina. Teniendo en cuenta este estudio comparativo y los resultados obtenidos de la investigación relacionada con la primera hipótesis, postulamos que un defecto de SH3TC2 en la célula de Schwann podría alterar negativamente la señalización de la ruta Nrg1/ErbB, y consecuentemente causar anomalías en los procesos de formación de la mielina.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es investigar el mecanismo patogénico que subyace a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C (CMT4C) causada por mutaciones en el gen *SH3TC2*. Los objetivos específicos que se han desarrollado secuencialmente son:

Objetivo 1. Estudiar la localización y la función celular de la proteína SH3TC2 y los efectos que sobre dichas funciones tienen las mutaciones clínicas responsables de la neuropatía desmielinizante CMT4C.

Objetivo 2. Investigar el mecanismo fisiopatológico según el cual un defecto de SH3TC2 causa la neuropatía en los pacientes afectados de CMT4C, mediante el análisis de la posible implicación de SH3TC2 en la ruta de señalización Nrg1/ErbB empleando el modelo de ratón *Sh3tc2^{-/-}*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Vectores de clonación y de expresión en células de mamíferos

Para la clonación de los fragmentos de cDNA obtenidos mediante PCR, y a partir de una genoteca de cDNA de cerebro humano (Invitrogen), se utilizó el vector de clonación **pGEM-T** (Promega). Se trata de un vector linealizado con timidinas en ambos extremos compatibles con las adeninas producidas por la polimerasa en la reacción de PCR (**Anexo I**).

Los insertos de los clones IMAGE (Geneservice Ltd.), utilizados para la obtención de la ORF más larga de SH3TC2, estaban clonados en el vector **pCMV-SPORT 6** (ID: 6048901, 6055718, y 2905708) (**Anexo I**).

A continuación, se describen los vectores empleados para la sobreexpresión de SH3TC2 en líneas celulares (**Anexo I**):

-**pEGFP-C1** y **pEGFP-N1** (Clontech), necesarios para expresar la proteína SH3TC2 en pauta con la GFP, respectivamente en el extremo N y C terminal.

-**pDNA3-HA**, cedido por el Dr. Domingo Baretino, se utilizó para sobreexpresar SH3TC2 y sus mutantes, etiquetadas con HA en el extremo C-terminal.

-**pCMV-Myc** (Clontech), se utilizó para sobreexpresar SH3TC2, etiquetada con Myc en el extremo N-terminal.

-**pFLAG**, vector que incluía la ORF de ErbB2 etiquetada con FLAG en el extremo N-terminal, fue cedido por el Dr. Yanmei Tao.

2. Clonaciones y subclonaciones

La obtención de los insertos de cDNA se realizó mediante amplificación por PCR usando el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), las enzimas DNA polimerasa (Biotools) o *Pfu* DNA polimerasa

(Stratagene), y un programa de tiempos y temperaturas adecuado a la extensión y naturaleza génica del fragmento.

Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de cDNA amplificados por PCR y/o digeridos con la enzima de restricción correspondiente, se purificaron utilizando el kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen). En algunos casos los vectores se trataron con fosfatasa alcalina (Roche) para desfosforilar los extremos 5' y evitar procesos de religación. Para la ligación de los plásmidos se utilizó la *T4 DNA ligasa* (Promega).

La obtención del clon de interés se realizó transformando cepas de *E. coli* DH5 α electrocompetentes, con la ligación obtenida mediante electroporación a 1.700 voltios. La extracción de DNA plasmídico de las colonias de bacterias que contienen el inserto de interés, se realizó a partir de un inóculo de 3-4 mL de la colonia positiva mediante el kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche). La obtención de DNA a gran escala se llevó a cabo con el kit *HiPure Plasmid MaxiPrep* (Invitrogen).

2.1. Clonación del cDNA humano de SH3TC2

La ORF más larga de *SH3TC2*, se obtuvo empleando una genoteca de cDNA de cerebro humano y tres clones IMAGE (ID: 6048901; 6055718; 2905708). En primer lugar, se clonó la secuencia completa de *SH3TC2*, que incluye una inserción de 130 pb entre los exones 8 y 9 [*SH3TC2* (*E8A*)], mediante la ligación de tres fragmentos (**figura 8**):

- **F1**, un fragmento de 3.344 pb, que comprende desde el exón 6 (E6) hasta el codón de parada (TGA) de *SH3TC2*, pero además contiene la inserción de 130 pb. Este fragmento ha sido amplificado mediante PCR con los cebadores 1 y 2 (**Anexo II**) a partir de una genoteca de cerebro humano, cedida por el Dr. Jordi Pérez Tur, y subclonado en el vector pGEM-T.

- **F2**, obtenido a partir de un clon IMAGE (ID: 6048901), que contenía una secuencia de *SH3TC2* desde el codón de inicio (ATG) hasta parte del exón 5 (E5).
- **F3**, obtenido a partir de otro clon IMAGE (ID: 6055718), que contenía una secuencia de *SH3TC2* desde el exón 1 hasta parte del exón 8 (E8).

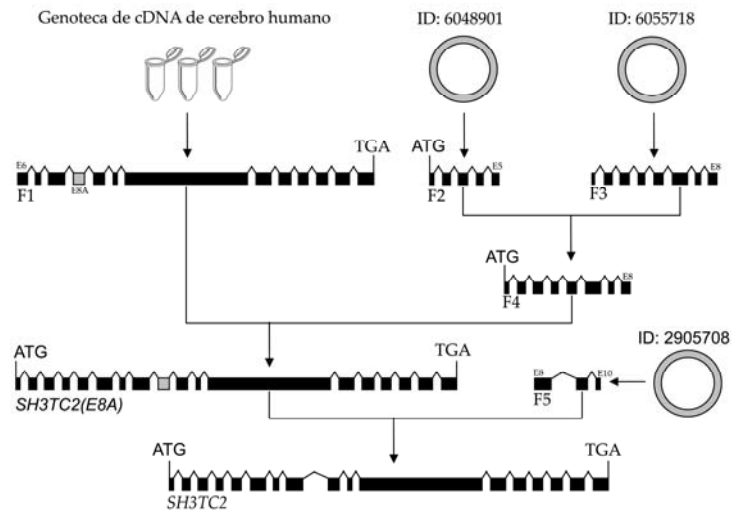


Fig 8. Esquema de la obtención y clonación de la ORF más larga de *SH3TC2*. Los fragmentos **F2** y **F3**, obtenidos a partir de dos clones IMAGE (ID: 6048901 y 6055718 respectivamente), junto con el fragmento **F1**, obtenido a partir de una genoteca de cDNA de cerebro humano, se ligaron, para así obtener el cDNA de *SH3TC2* (*E8A*). Finalmente, empleando otro clon IMAGE (ID: 2905708), se eliminó la inserción de 130 pb (*E8A*), obteniendo así el cDNA completo de *SH3TC2*.

Como se muestra en el esquema de la **figura 8**, los fragmentos **F2** y **F3**, digeridos con las enzimas de restricción *Bpi*I y *Bam*HI, se ligaron, obteniendo así un nuevo fragmento (**F4**), que comprende la secuencia de *SH3TC2* desde el ATG hasta una parte del exón 8. Este último fragmento **F4**, junto con el fragmento **F1**, previamente subclonado en el vector pEGFP-C1 (ver apartado 2.2 – Subclonaciones y mutagénesis dirigida), se digirieron con *Sac*II y *Bsm*I, y los fragmentos de interés purificados, se

ligaron, obteniendo así el cDNA de *SH3TC2 (E8A)* en el vector pEGFP-C1. Finalmente, tanto el cDNA de *SH3TC2 (E8A)* como el fragmento **F5**, procedente de otro clon IMAGE (ID: 2905708), se digirieron con *AccI*. El fragmento **F5** contiene una pequeña secuencia continua E8-E10, y carece del E8A. Posteriormente, el fragmento liberado de *SH3TC2 (E8A)*, que abarca los exones 8, 8A, 9 y 10, fue remplazado por el fragmento **F5** digerido y purificado (**Fig. 8**). Así pues, se consiguió clonar el cDNA de *SH3TC2* en el vector pEGFP-C1 (GFP-*SH3TC2*).

2.2. Subclonaciones y mutagénesis dirigida

Las construcciones de *SH3TC2* se generaron mediante la subclonación de la secuencia de interés, amplificada por PCR y digerida con las enzimas adecuadas, en los vectores digeridos y purificados correspondientes. En el caso de Δ SH3, dos fragmentos, N-t y C-t, se amplificaron mediante PCR, y posteriormente se subclonaron en pauta en el vector pcDNA3-HA, en los sitios de restricción *KpnI* y *EcoRV*. Los mutantes de *SH3TC2*, p.G2A, p.G3A, y las mutaciones patológicas p.R529Q, p.E657K, p.R658C, y p.A758D, se generaron mediante mutagénesis dirigida, utilizando la técnica de PCR por círculo rodante, y con cebadores que presentaban el cambio nucleotídico correspondiente. Las condiciones empleadas se establecieron en base al protocolo descrito en el kit *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). La construcción ErbB2-FLAG, subclonada en el vector pCMV-FLAG, fue cedida por el Dr. Yanmei Tao.

En **la tabla 2**, se detallan las construcciones empleadas, y en los **Anexos I y II** se muestran respectivamente los cebadores y los vectores de expresión utilizados.

Tabla 2. Características de las construcciones empleadas en este trabajo.

Construcción	Cebadores	Vector	Características
GFP-SH3TC2	3 y 4	pEGFP-C1	SH3TC2 en pauta con GFP en N-t
SH3TC2-GFP	5 y 6	pEGFP-N1	SH3TC2 en pauta con GFP en N-t
SH3TC2-HA	7 y 8	pcDNA3-HA	SH3TC2 en pauta con HA en C-t
Myc-SH3TC2	9 y 10	pCMV-Myc	SH3TC2 en pauta con Myc en N-t
Δ myr	11 y 12	pcDNA3-HA	SH3TC2 carente del dominio de miriostilación
Δ SH3TPRs	7 y 13	pcDNA3-HA	SH3TC2 carente de los dominios SH3 y TPR
Δ TPRs	7 y 14	pcDNA3-HA	SH3TC2 carente de los dominios TPR
Δ SH3s	7 y 18 (N-t) 19 y 20 (C-t)	pcDNA3-HA	SH3TC2 carente de los dominios SH3
Myr-TPR1	7 y 21	pcDNA3-HA	Primer dominio TPR (TPR1) fusionado al dominio de miriostilación
p.C737_P738delinsX	7 y 15	pcDNA3-HA	SH3TC2 truncada (mutación patológica)
p.R954X	7 y 16	pcDNA3-HA	SH3TC2 truncada (mutación patológica)
p.R1109X	7 y 17	pcDNA3-HA	SH3TC2 truncada (mutación patológica)
p.G2A	22 y 23	pcDNA3-HA	SH3TC2 mutada en la glicina 2
p.G3A	24 y 25	pcDNA3-HA	SH3TC2 mutada en la glicina 3
p.R529Q	26 y 27	pcDNA3-HA	SH3TC2 con cambio de aminoácido patológico (Arg>Gln)
p.E657K	28 y 29	pcDNA3-HA	SH3TC2 con cambio de aminoácido patológico (Glu>Lys)
p.R658C	30 y 31	pcDNA3-HA	SH3TC2 con cambio de aminoácido patológico (Arg>Cys)
p.A758D	32 y 33	pcDNA3-HA	SH3TC2 con cambio de aminoácido patológico (Ala>Asp)
ErbB2-FLAG	-	pCMV-FLAG	Receptor ErbB2 en pauta con FLAF en C-t

Las secuencias de todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación automática en un analizador genético *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3. Material biológico y condiciones de crecimiento

3.1. Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* DH5 α fue usada como hospedador para la producción de todos los plásmidos utilizados en este trabajo. Fue crecida en el medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. Para la selección de plásmidos se utilizaron distintos antibióticos en función del gen de resistencia presente: 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina; 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina; 37 $\mu\text{g/mL}$ de cloramfenicol.

3.2. Cultivos de líneas celulares inmortalizadas

La manipulación de cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar de bioseguridad de tipo II/B3, y el crecimiento de los cultivos celulares se llevó a cabo en un incubador humidificado con 5% de CO $_2$ y a una temperatura de 37°C. Salvo algunas excepciones, todas las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS suplementado con 2 mM de glutamina, 100 U.I./mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina. Para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron pases de tripsinización cada 2/3 días. Todas las líneas celulares utilizadas tienen un crecimiento en monocapa de forma adherente.

Para la criopreservación de las células, éstas se resuspendieron en el correspondiente medio de cultivo suplementado con un 20% (v/v) de FBS, al que se le adicionó un 10% (v/v) de DMSO y después de ser alicuotadas en criotubos se congelaron a -80°C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37°C, diluyendo las células en el medio correspondiente y recogéndolas mediante centrifugación. Finalmente, las células se sembraron en el medio de cultivo correspondiente.

Las líneas celulares empleadas en este trabajo se detallan a continuación:

- **COS-7**, células de fibroblastos de riñón de mono africano inmortalizadas con el virus SV40. Se escogieron como modelo celular para los estudios de localización y fraccionamiento celular.

- **HeLa**, células tumorales estabilizadas humanas, procedentes de cáncer de cérvix. Estas células se emplearon en los estudios de localización, fraccionamiento celular y ensayos de endocitosis.

- **RT4-D6P2T**, células de Schwann de rata. Esta línea celular se estableció a partir de un neurotumor periférico inducido en rata, y tras realizar pases sucesivos hasta obtener una línea glial específica. Estas células se seleccionaron para el análisis de expresión y de localización de *SH3TC2*.

- **SW10**, células de Schwann procedente de cultivos primario de células de Schwann de ratón infectadas e inmortalizadas con el virus SV40. Estas células se eligieron como modelo celular para el estudio de localización celular y de expresión de *SH3TC2*.

- **HEI-193**, células de Schwannoma humanas procedente de un tumor de Schwann de un paciente con Neurofibromatosis tipo II (NF2), e inmortalizadas. Estas células se emplearon para el estudio de expresión y de localización de *SH3TC2*.

- **SH-SY5Y**, células de neuroblastoma humano. Estas células se mantienen en cultivo en medio Ham's F12:EMEM (1:1), suplementado con las mismas concentraciones de FBS, glutamina y antibióticos mencionado anteriormente. Estas células se emplearon para el estudio de expresión de *SH3TC2*.

El método de transfección transitoria usado para la línea celular COS-7 fue el del fosfato cálcico, empleando el kit *CAPHOS* (Sigma-Aldrich). Para las líneas celulares de HeLa, SW10, RT4-D6P2T, y HEI-193

se utilizó el *FuGene HD* o *FuGene 6* (Roche), un reactivo basado en lípidos catiónicos capaces de atravesar la membrana plasmática. Tanto para las transfecciones con un sólo plásmido, como para las dobles transfecciones, el ratio *FuGene* (μL): DNA plasmídico (μg) utilizado fue generalmente de 5:2.

4. Inmunofluorescencia en células en cultivo

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos sobre cubres de vidrio. Tras ser transfectadas con los plásmidos de interés, las células se fijaron con paraformaldheído (PFA) al 4% (p/v) en PBS, excepto en el caso de la inmunofluorescencia doble simultánea para la detección de SH3TC2-HA y Na,K ATPasa que se fijaron y permeabilizaron mediante tratamiento con metanol durante 20 min a -20°C .

Las células fijadas, tras ser permeabilizadas con Triton X-100 al 0.5% (p/v) en PBS durante 30 min, se incubaron con tampón de bloqueo [FBS al 10% (v/v), Triton X-100 al 0.1% (p/v), BSA al 0.5% (p/v) en PBS] durante 1 h, y finalmente con los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C . Los diferentes anticuerpos primarios y sus características se describen en la **tabla 3**. Al día siguiente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados: anti-IgG de conejo o de ratón, conjugados a Alexa Fluor 488 ó 633 (Invitrogen).

Tras la inmunotinción, las muestras se montaron con *Fluoromont-G* (Southern Biotech) y las imágenes se tomaron en el microscopio *Leica TCS SP Confocal System*, con un objetivo de inmersión 63X.

La detección de SH3TC2-GFP y GFP-SH3TC2 no se realizó con anticuerpos, sino que directamente al microscopio, debido a la capacidad de la misma GFP de emitir fluorescencia.

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados para los ensayos de inmunofluorescencia.

MB: Membrana plasmática; RE: Retículo endoplásmico GRP-94: *Glucose-regulated protein of 94 kDa*; EEA1: *Early endosome antigen 1*; M6PR: *Mannose-6-phosphate receptor*; CHC: *Clatrin-heavy-chain*; PMP70: *Peroxisomal membrane protein 70*; LAMP1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*

Anticuerpo	Origen	Casa Comercial	Dilución	Orgánulo / Epítipo
Anti-Na,K ATPasa	Monoclonal de ratón	Abcam	1:100	MB
Anti-GRP-94	Policlonal de conejo	Abcam	1:100	RE
Anti-clatrina (CHC)	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:50	Vesículas recubiertas de clatrina
Anti-EEA1	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:100	Endosomas tempranos
Anti-M6PR	Monoclonal de ratón	Abcam	1:100	Endosomas tardíos y <i>trans</i> -Golgi
Anti-PMP70	Policlonal de conejo	Invitrogen	1:100	Peroxisomas
Anti-LAMP1 (H4A3)	Monoclonal de ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:30	Lisosomas
Anti-HA	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:250	HA
Anti-HA	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:250	HA
Anti-c-Myc	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:1000	Myc
Anti-c-Myc	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:1000	Myc
Anti-FLAG	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:500	FLAG

4.1. Tratamiento de células con óxido de fenilarsina

En el estudio de localización subcelular de SH3TC2 y ErbB2, tras tratamiento con óxido de fenilarsina (PAO, *Phenylarsine oxide*), un inhibidor de la internalización de los receptores ErbB (Yang et al., 2005), las células se incubaron *in vivo* con 5 μ M de PAO (Sigma-Aldrich). Trascorrido 30 min, las células se fijaron con PFA al 4% y posteriormente se analizaron tal y como se describe en el apartado anterior.

4.2. Estudio de la internalización de ErbB2 y su asociación con SH3TC2

Células HeLa, co-transfectadas con SH3TC2-HA y ErbB2-FLAG, se procesaron mediante la técnica del *antibody feeding* (Arancibia-Carcamo et al., 2006), que permite estudiar la internalización de los receptores de membrana. Tras 24 h de transfección, las células se incubaron con anti-FLAG durante 30 min a 4°C, para marcar ErbB2 en la superficie celular. Tras dos lavados con PBS, las células se incubaron a 37°C a cuatro tiempos distintos (0, 5, 15 y 30 min) en medio DMEM suplementado con Nrg1 (10 nM) para reactivar la endocitosis. A continuación, las células se fijaron con PFA al 4%, se permeabilizaron con tritón 0,2 % durante 10 min y posteriormente se incubaron con anti-HA durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o de ratón, conjugados a Alexa Fluor 488 ó 633 (Invitrogen). La **figura 9** ilustra un esquema del protocolo empleado.

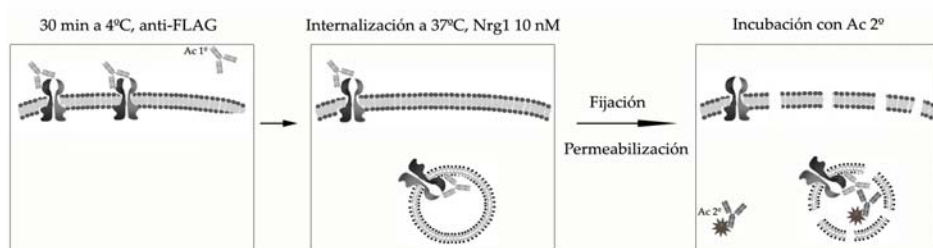


Fig. 9: Esquema representativo de la técnica de *antibody feeding*. ErbB2-FLAG (E), presente en la superficie celular se marcó con anti-FLAG (Ac 1º), y posteriormente internalizó a 37°C. Una vez fijadas y permeabilizadas las células, ErbB2 internalizado se detectó mediante un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Ac 2º).

5. Preparación de fracciones subcelulares

5.1. Estudio del grado de asociación de SH3TC2 con las membranas celulares

Para determinar el grado de asociación de SH3TC2-HA con las membranas celulares, las células transfectadas se recogieron en tampón PBS, y posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 1.200 g. El precipitado celular obtenido se procesó como se detalla a continuación:

1. Resuspensión del precipitado celular en 1 mL de tampón de lisis [Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgCl₂ 2,5 mM, Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)]
2. Incubación en hielo durante 15 min.
3. Homogeneización del lisado mediante 25 golpes en un homogeneizador manual de vidrio esmerilado tipo Dounce de 2 mL (Wheaton Science Products).
4. Los lisados obtenidos se depositaron cuidadosamente sobre un cojín de sacarosa (sacarosa 0,5 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgCl₂ 2,5 mM).
5. Centrifugación a 5.000 g durante 10 min a 4°C. Se recogió la capa superior que consiste en la fracción citoplasmática.
6. Centrifugación del extracto citoplasmático a 100.000 g durante 1 h en el rotor de ángulo fijo MLA-130 (Beckmann-Coulter). Tras esta centrifugación se obtiene una fase soluble del sobrenadante y un precipitado de proteínas asociadas a membranas.
7. Resuspensión del precipitado en 100 µl de tampón de alta fuerza iónica [(Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 750 mM, Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)].
8. Centrifugación durante 1 h a 100.000 g, obteniendo un sobrenadante de alta fuerza iónica (S100/NaCl) y un precipitado. El sobrenadante se guardó para su posterior análisis.

9. Resuspensión del precipitado en 100 μ l de tampón a alto pH [(Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, Na₂CO₃ 100 mM, suplementado con Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)].
10. Centrifugación durante 1 h a 100.000 g, obteniendo un sobrenadante a alto pH (S100/ Na₂CO₃) y un precipitado. El sobrenadante se guardó para su posterior análisis.
11. Resuspensión del precipitado final en 100 μ l de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, DTT 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato 0.5%) suplementado con Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche). Esta suspensión (P100/final) se guardó para su posterior análisis.

Todas las fracciones obtenidas, a partir de un volumen equivalente de células, se resolvieron en un SDS-PAGE y posteriormente se analizaron mediante *Western blot*.

5.2. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa

Las preparaciones enriquecidas en membranas, procedentes de 2 placas de 100 mm de diámetro cultivadas con células de COS-7 o HeLa, se procesaron mediante fraccionamiento subcelular siguiendo el protocolo previamente descrito por Coppi *et al.* (Coppi and Guidotti, 1997), con las modificaciones que se detallan a continuación.

Preparación de la fracción enriquecida de membranas:

1. Dos lavados de las células con 10 mL de PBS modificado (suplementado con NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, y KH₂PO₄ 1,5 mM)
2. Incubación de 5 min con Na₂EDTA 5mM en PBS, y posterior recogida de las células en el mismo tampón mediante raspado.
3. Centrifugación a 1.000 g durante 5 min, y resuspensión de las células en 1 mL de tampón de lisis hipotónico frío [sacarosa 50

mM, Hepes 10 mM, pH 7,4, Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)].

4. Homogeneización mediante 25 golpes en el homogeneizador manual de vidrio esmerilado tipo Dounce de 2 mL (Wheaton Science Products) y el émbolo tipo *tight*. A éste se le añadieron 132 µL de sacarosa al 65% (p/p) en Hepes 10 mM, pH 7,4, 2 µL de MgCl₂ 0,5 M, y 6,6 µL de aprotinina 2,5 mg/mL, para generar un ambiente isotónico.
5. Centrifugación a 1.000 g durante 10 min a 4°C, para eliminar las células no lisadas y los núcleos. Se recogió el sobrenadante.
6. Centrifugación del sobrenadante durante 30 min a 100.000 g a 4°C. El precipitado obtenido es la fracción enriquecida de membranas.

Obtención de las fracciones subcelulares mediante gradiente de sacarosa

1. Resuspensión de la fracción enriquecidas de membranas en 252 µL de Hepes 10 mM, pH 7,4, mediante 15 golpes con un homogeneizador de vidrio y el émbolo tipo *Thomas 0448 Teflon* de 2 mL. Esta suspensión se combinó con 828 µL de sacarosa 65% en Hepes 10 mM, pH 7,4, y posteriormente se depositó a la base de un tubo de polialómero de 4 mL para el rotor de ángulo oscilante SW60 Ti (Beckmann-Coulter).
2. Las muestras fueron sobrecargadas con 360 µL de sacarosa con porcentajes decrecientes: 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, y 10 (p/p en Hepes 10 mM, pH 7,4).
3. Centrifugación de las muestras a 84.000 g durante 18 h a 4°C.
4. Recogida de 14 fracciones de 270 µL cada una.
5. Dilución de cada fracción con un volumen de 2,16 mL de PBS en tubos de policarbonato para el rotor de ángulo fijo Beckmann TLA-110 (Beckmann-Coulter).
6. Centrifugación de cada fracción de membranas a 100.000 g durante 1 h a 4°C. El precipitado de membranas se resuspendió

directamente en el tampón de carga de proteínas 2X para su posterior análisis.

5.3. Purificación de *lipid rafts*

Los gradientes de flotación para la purificación de los dominios de membranas enriquecidos en colesterol (*lipid rafts*) se llevaron a cabo en células COS-7 transfectadas con SH3TC2-HA como se detalla a continuación:

1. Recogida de las células a las 24h de la transfección.
2. Resuspensión de las células en 500 µl de tampón TNE [(Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)]
3. Homogeneización con 25-40 golpes en el homogeneizador manual de vidrio esmerilado tipo Dounce de 2 mL (Wheaton Science Products).
4. Eliminación de los núcleos y células no lisadas mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 min a 4° C.
5. Incubación del lisado celular durante 30 min en hielo, y añadiendo Triton-X100 a una concentración final del 1%.
6. Después de la extracción con TX-100, al lisado (aproximadamente 400 µl) se le añadieron 800 µl de la solución de Optiprep (Sigma-Aldrich), hasta obtener una concentración de Optiprep del 40%, y por encima de éste se depositaron 2.4 mL de Optiprep al 30% en TXNE (TNE, 0,1% TX100) y por último 400 µl de TXNE.
7. Centrifugación de las muestras a 164.000 g durante 18 h en el rotor SW60Ti (Beckmann Coulter) a 4°C.

Al día siguiente, se recogieron las distintas fracciones desde la capa superior, y se precipitaron añadiendo dos volúmenes de TCA al 15%. Finalmente, el precipitado de cada fracción se resuspendió en el tampón de carga de proteínas y posteriormente se procedió al análisis mediante *Western blot*.

6. Análisis de proteínas

6.1. Obtención de extractos proteicos

Como hemos mencionado anteriormente, para la obtención de extractos proteicos de células, éstas se recogieron mediante raspado en tampón PBS. Salvo que no se especifique lo contrario, para el análisis de lisado total, las células, tras ser centrifugadas para eliminar los núcleos y las células no rotas, se lisaron en tampón RIPA, y a continuación se centrifugaron durante 10 min a 11.000 g. El sobrenadante se designó como lisado celular. Para la extracción de extractos proteicos de nervio ciático, el *endoneurium* de éste se resuspendió directamente en el tampón de lisis correspondiente (ver apartado 9.1 – Preparación de extractos proteicos de nervio ciático). Todos los procedimientos de lisis y obtención de extractos se realizaron a 4°C. La cuantificación de los extractos proteicos de todas las muestras analizadas, se realizó mediante el kit *BCA assay* (Thermo-Scientific).

6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección mediante *Western Blot*

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE usando geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida (8-12,5 %). Las muestras diluidas en tampón de carga de proteínas [Tris HCl 45 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01 %, SDS 1 %, DTT 50 mM] se desnaturalizaron durante 5 min a 96-100°C, antes de ser cargadas en un sistema electroforético *Miniprotein Electrophoresis System* (BioRad). La electroforesis se realizó a 100 voltios constantes y en un tampón compuesto por glicina 0,192 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v). La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (*BioTrace PVDF*, Pall Corporation) durante 2 h a 100 voltios constantes a 4°C, y en tampón compuesto por glicina 0,192 M, Tris 25 mM, metanol 20% (v/v). Tras la transferencia, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau S, con el fin de comprobar la eficacia de la transferencia. Posteriormente,

las membranas se lavaron con TBS-T [Tris HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)] y seguidamente se incubaron en la solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% o BSA al 5% en TBS-T), durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios específicos correspondientes disueltos en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras 4 lavados de 10 min con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h con los correspondientes anticuerpos secundarios de conejo o de ratón, conjugados con HRP. Finalmente, las proteínas se detectaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia *ECL* o *ECL Plus* (Amersham Biosciences). La imagen se obtuvo mediante revelado de película fotográfica o mediante un lector electrónico *LAS-3000* (FUJIFILM), y la densitometría se analizó con el programa *IMAGE J*.

Todos los anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de las proteínas se detallan en la **tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de proteínas mediante *Western Blot*.

SCB*: Santa Cruz Biotechnologies.

Anticuerpo	Origen	Empresa	Dilución
anti-HA	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1/1000
anti-HA	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1/1000
anti-FLAG	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1/1000
anti-EEA1	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1/1000
Anti-Na,K ATPasa	Monoclonal de ratón	Abcam	1/1000
anti-Nrg1	Monoclonal de ratón	SCB*	1/200
anti-ErbB2	Policlonal de conejo	SCB*	1/200
Anti-p-ErbB2	Policlonal de conejo	SCB*	1/200
anti-ErbB3	Monoclonal de ratón	SCB*	1/200
anti-pErbB3	Monoclonal de ratón	Cell Signaling	1/500
Anti-Rab7	Policlonal de conejo	SCB*	1/200
Anti-Krox20	Policlonal de conejo	Covance	1/500

7. Análisis de RNA

La extracción de RNA, tanto de células en cultivo como de tejidos de ratón, se llevó a cabo empleando el kit *RNeasy mini* ó el kit *RNeasy lipid tissue* (Qiagen). En el caso de las células se recogieron aproximadamente 3-4 millones de células en cultivo. En cambio, para la extracción de RNA de tejidos se utilizaron aproximadamente 30 mg del tejido correspondiente. El extracto de RNA obtenido se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Todos los reactivos y tubos que se utilizaron durante todo el protocolo de extracción de RNA estaban libres de RNAasas. La concentración de RNA se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda y su pureza se estimó en base a la relación A260/280.

7.1. Retrotranscripción y análisis de expresión de RNA total

La obtención de cDNA para el análisis de expresión de *SH3TC2* en varios tejidos y en células en cultivo, se realizó mediante la retrotranscripción (RT) de 0,5-1 µg de RNA con la enzima *Expand Reverse Transcriptase* (Roche) y los cebadores *random hexamer*. Tras la obtención del cDNA, se generó un producto de PCR de 528 pb con los cebadores 34 y 35 (**Anexo II**). Los cebadores utilizados hibridan tanto la secuencia de *SH3TC2* humana, como la de rata y de ratón, y fueron diseñados para evitar amplificaciones de DNA genómico contaminante. Como control positivo de la síntesis de cDNA mediante RT se utilizó *GAPDH* (cebadores 36 y 37, **Anexo II**). Los productos de PCR obtenidos se confirmaron mediante secuenciación automática en un analizador genético *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

7.2. PCR cuantitativa a tiempo real

La expresión de *Sh3tc2* murina se estudió mediante el análisis de PCR cuantitativa a tiempo real a partir de RNA de nervio ciático de

ratón. 250-500 ng del RNA total obtenido se sometió a retrotranscripción usando el enzima *SuperscriptTM III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). La PCR en tiempo real de *Sh3tc2* se realizó usando un *ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR system* y *SYBR Green* (Applied Biosystem). Los cebadores empleados (38 y 39, **Anexo I**) se diseñaron para evitar amplificaciones con el DNA genómico. Las condiciones de la reacción fueron 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C. Los resultados cuantificados se normalizaron usando como referencia los genes *Gapdh* o *Ubiquitina*.

8. Mantenimiento de ratones de experimentación

Para estudiar el efecto de la deficiencia de la proteína Sh3tc2 sobre la ruta de señalización Nrg1/ErbB y para los estudios de microscopía electrónica en cortes ultrafinos de nervio ciático, se emplearon ratones WT (*Sh3tc2^{+/+}*) y KO de *Sh3tc2* (*Sh3tc2^{-/-}*). Los ratones deficientes de *Sh3tc2* habían sido generados en el laboratorio del Dr. Roman Chrast (Arnaud et al., 2009) y mantenidos en el animalario del departamento de Genética y Biología molecular de la Universidad de Lausanne.

9. Extracción y procesamiento de nervio ciático de ratón

Ratones de distintas edades se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano, y posteriormente se sacrificaron mediante dislocación cervical o decapitación. Ambos nervios ciáticos fueron expuestos y diseccionados bajo un microscopio binocular. Los nervios ciáticos extraídos se lavaron con PBS frío, se eliminó la grasa y la sangre residual y en el caso de los ratones de edad mayor a 15 días (P15) se descartó el *epineurium*. Finalmente, el *endoneurium* de los nervios ciáticos se procesó para el protocolo experimental correspondiente.

9.1. Preparación de extractos proteicos de nervio ciático

Los nervios ciáticos se homogeneizaron en el tampón de lisis PN2 [Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 95mM, EDTA 10 mM, SDS 2%, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, e inhibidores de proteasas (Complete®, Roche)] en el *Qiagen Tissue Lyzer* (Qiagen), empleando bolas metálicas de lisis (Qiagen) y tras 3 ciclos de 30 segundos y F=1/30. El lisado se centrifugó a 11.000 g durante 10 min y el sobrenadante se designó como extracto proteico total. En algunos casos, para aumentar la eficiencia de extracción de los receptores de membrana ErbB2 y ErbB3, el homogeneizado, se incubó a 96°C durante 5 min. Finalmente, 20-30 µg de extracto total de proteínas se cargaron en el gel SDS-PAGE para ser analizadas mediante *Western blot*.

9.2. Análisis de microscopía electrónica

Para el análisis cuantitativo del número de capas de mielina que envuelven los axones, los nervios ciáticos diseccionados de ratones P5 y P10, se fijaron con PFA 1% y glutaraldehído 2% en tampón cacodilato 0.1M, y posteriormente se incubaron en OsO₄ 1% durante 4 h. Los nervios se enjuagaron, después se deshidrataron, y posteriormente se embebieron en resina *Epon 812* (Fluka). Finalmente, secciones ultrafinas se depositaron en una rejilla para microscopía electrónica recubierta de celoidina, y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico Philips CM 10.

10. Ensayos de biotilación

El ensayo de biotilación se llevó a cabo usando el método de biotilación de proteínas de membrana descrito previamente (Yang et al., 2005). Después de 24 h de transfección, las células HeLa fueron biotiladas con 0,5 mg/mL de *sulfo-NHS-SS-biotin* (Pierce) en PBS a 4°C durante 30 min. El *sulfo-NHS-SS-biotin* es un reactivo químico impermeable a las membranas plasmáticas, capaz de biotilar los grupos aminos libres de proteínas de la superficie celular. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron para ser analizados mediante *Western blot*, o bien se procesaron para el ensayo de internalización.

10.1. Ensayo de internalización

Tras tratamiento con *NHS-SS-biotin*, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y posteriormente se incubaron a 37°C en medio DMEM suplementado con neuregulina 1 (Nrg1) 10 nM (R&D system), para reactivar la internalización de los receptores ErbB. Tras distintos tiempos de incubación (0, 15 y 30 min), las células se lavaron 2 veces con tampón glutatión (glutatión 50 mM, NaCl 75 mM, EDTA 10 mM, BSA 1%, NaOH 0,075 N), permitiendo la ruptura del enlace entre la biotina del *sulfo-NHS-SS-biotin* y las proteínas de la superficie celular. De esta forma las únicas proteínas biotiladas serán las que han sido internalizadas. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se recogieron con PBS mediante raspado celular. Una vez centrifugadas, se lisaron con tampón RIPA. La **figura 10** representa un esquema ilustrativo del ensayo de internalización.

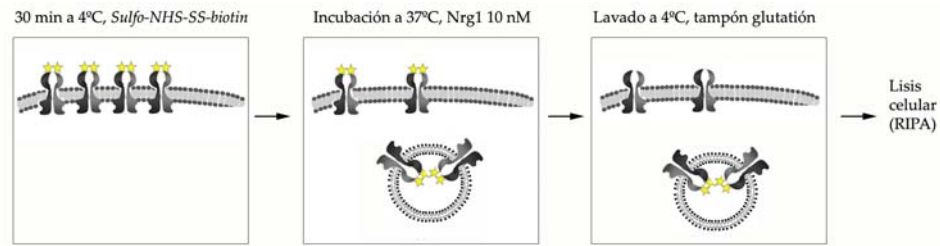


Fig. 10. Esquema ilustrativo del ensayo de internalización. Los receptores ErbB de la superficie celular (♁) se biotinilaron con el *Sulfo-NHS-SS-biotin* (★), se incubaron a 37°C con Nrg1, se lavaron con tampón glutatión, y finalmente lisaron con tampón RIPA.

Una alícuota del lisado celular se guardó para la determinación de la proteína total, y el resto del lisado se incubó con bolas magnéticas de estreptavidina (Pierce) a 4°C durante toda la noche en un agitador rotatorio. Al día siguiente, las bolas de estreptavidinas unidas a las proteínas biotiniladas se lavaron con tampón TBS (Tris HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150 mM), y a continuación se resuspendieron en el tampón de carga de proteínas 2X. Para favorecer la separación de las proteínas biotiniladas de las bolas de estreptavidina, esta suspensión se hirvió a 96-100 °C durante 5 min, y finalmente las proteínas biotiniladas se separaron mediante *SDS-PAGE* e inmunodetectaron mediante *Western blot*.

11. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo aplicando el test de la t student de dos colas. Los valores mostrados representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (n=3). Para la significatividad de cada caso se considera el siguiente p-valor: $p < 0.01$ (**).

RESULTADOS

CAPÍTULO I

“Mutaciones patológicas de *SH3TC2* alteran la localización de la proteína en la membrana plasmática y en orgánulos de la ruta endocítica”

1. Expresión tisular y celular de *SH3TC2*

Como se ha descrito en la introducción, los pocos datos publicados sobre *SH3TC2*, mostraban que la isoforma humana se expresa en tejidos neurales (Senderek et al., 2003a). Nuestro análisis de expresión indica que *SH3TC2* se expresa tanto en tejido neural (nervio ciático y cerebro), como también en tejidos no neurales (bazo, pulmón, hígado y riñón) (**Fig. 11**). El análisis de expresión en diferentes líneas celulares, muestra una expresión de *SH3TC2* exclusivamente en RT4-D6P2T, HEI-193, y débilmente en SW10, tres líneas celulares de Schwann procedentes de rata, de humano y de ratón respectivamente (**Fig. 11**).

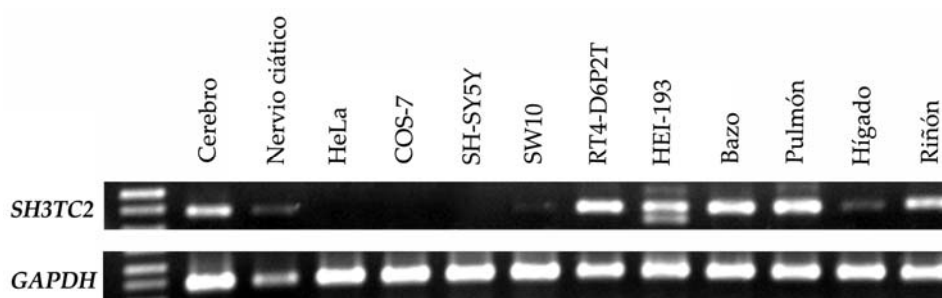


Fig. 11: Análisis de expresión de *SH3TC2*. Amplificación de un fragmento de 528 pb (exones 13-16 de *SH3TC2*) mediante PCR, utilizando como molde el cDNA obtenido de la retrotranscripción (RT) del RNA total de distintos tejidos de ratón, y de líneas celulares diferentes. Como control positivo de la síntesis de cDNA mediante RT se utilizó *GAPDH*.

2. Clonación de *SH3TC2*

El cDNA humano de *SH3TC2* presenta una ORF completa de 3.867 nucleótidos. Las mutaciones patológicas descritas hasta la fecha son muy heterogéneas y se distribuyen a lo largo de casi todos los exones.

Con el fin de obtener la ORF más larga, se empleó una genoteca de cDNA de cerebro humano. Tras varios intentos de PCR, mediante el empleo de los cebadores 1 y 2 (**Anexo II**), se consiguió aislar un fragmento de *SH3TC2* de 3.344 pb, que comprende los exones 6-17,

incluyendo el codón de parada TGA (**F1**) (**Fig. 12A**). Este fragmento contiene también la inserción de 130 pb entre los exones 8 y 9 (E8A), que había sido anteriormente descrita en un transcrito de *splicing* de *SH3TC2* (Senderek et al., 2003a).

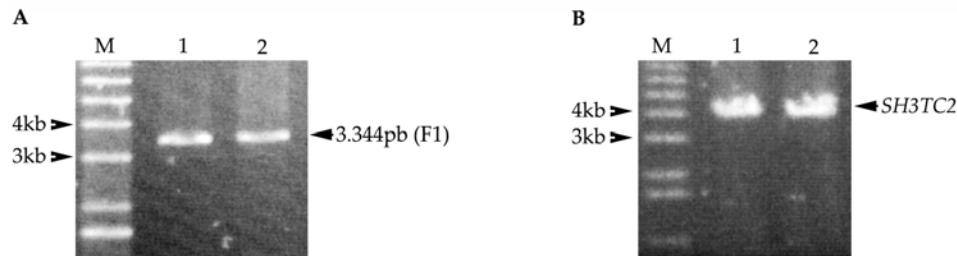


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. (A), (Carrera 1 y 2) Fragmento (F1) de SH3TC2 de 3.344 pb obtenido mediante PCR, a partir de una genoteca de cDNA de cerebro humano. (B), (Carrera 1 y 2) Producto de PCR amplificado tras la clonación de la ORF más larga de SH3TC2, en el vector pEGFP-C1. M: marcador de 1kb Plus (Invitrogen).

Con el fin de obtener la secuencia completa de *SH3TC2*, seleccionamos dos clones *I.M.A.G.E.*: ID: 6048901, que contiene una secuencia de *SH3TC2* desde el codón de inicio (ATG) hasta una región del exón 5 (E5) (**F2**); ID: 6055718, que contiene una secuencia de *SH3TC2* desde el exón 1 hasta una parte del exón 8 (E8) (**F3**). La unión de los fragmentos presentes en ambos clones (**F2+F3**), nos proporcionó un nuevo fragmento (**F4**), que contiene la secuencia de *SH3TC2* desde el codón de inicio (ATG) hasta una región del E8. De esta forma, tras la ligación de los fragmentos **F1** y **F4**, conseguimos clonar un transcrito de *SH3TC2* que contiene la inserción del E8A, denominado *SH3TC2* (E8A) (Esquema de clonación en Materiales y Métodos – **Fig. 8**).

Para lograr el cDNA codificante más largo de *SH3TC2*, recurrimos a otro clon IMAGE (ID: 2905708), que contiene una secuencia de *SH3TC2* que incluye los exones E8-E10, pero carece de la inserción de 130 pb (E8A) (**F5**). Finalmente, con la ayuda de este clon se consiguió la obtención de la ORF más larga de *SH3TC2*, en el vector pEGFP-C1 (**Fig.**

12B). En definitiva, hemos conseguido clonar el cDNA de *SH3TC2* para poder así llevar a cabo los estudios de biología molecular y celular realizados en este trabajo.

3. Localización celular de SH3TC2

El análisis *in silico* con programas de localización basados en la secuencia de la proteína (*PSORT II*) sugieren que *SH3TC2* podría estar localizada en el citoplasma (56.5% de probabilidad), en el núcleo (21,7%) y en mitocondrias (13%).

La expresión celular de *SH3TC2* se investigó mediante el empleo de construcciones de *SH3TC2* marcadas con etiquetas distintas:

- *SH3TC2*-GFP y GFP-*SH3TC2*
- *SH3TC2*-HA
- Myc-*SH3TC2*

Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia mostraban que dependiendo de la posición de la etiqueta la localización celular era completamente diferente. Mientras que Myc-*SH3TC2* y GFP-*SH3TC2* presentaban un patrón de expresión citoplasmático que solapaba con el marcador de retículo endoplásmico GRP-94 (**Fig. 13A**), *SH3TC2*-HA y *SH3TC2*-GFP mostraban un patrón vesicular perinuclear y de membrana plasmática, ya que colocaliza con el marcador de membrana plasmática Na,K ATPasa (**Fig. 13B, Anexo III**). De estos resultados, llegamos a la conclusión de que la posición de la etiqueta influye sobre la localización de la proteína.

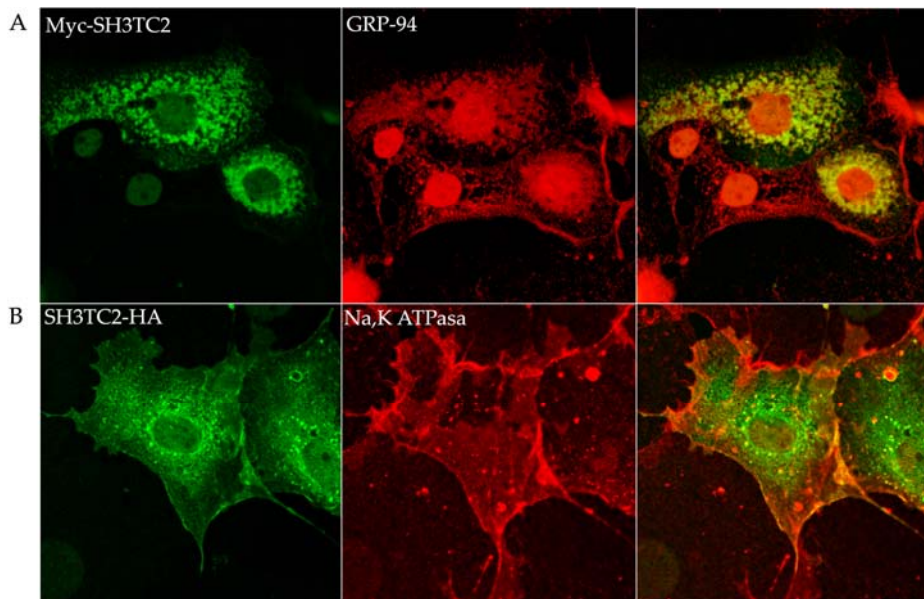


Fig. 13: Localización celular de SH3TC2. Las células COS-7 transfectadas con Myc-SH3TC2, se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-c-Myc y anti-GRP-94 (**A**), mientras que las células transfectadas con SH3TC2-HA, se inmunodetectaron con anti-HA y anti-Na,K ATPasa (**B**). La detección de -Myc y -HA se muestra en el canal verde, mientras que los marcadores de orgánulos (GRP-94 y Na,K ATPasa) en el canal rojo. En el panel derecho se muestra la colocalización, mediante la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

En tanto que el análisis *in silico* predijo la presencia de una posible señal de miristoilación en los primeros 7 aminoácidos (MGGCFI), se consideró la posibilidad de que la presencia de ésta podría ser determinante en la localización de SH3TC2. De ese modo, cualquier etiqueta adyacente al extremo N-terminal de la proteína, evitaría esta modificación *post*-traducional.

4. SH3TC2 sufre una N-miristoilación para anclarse a las membranas celulares

Para determinar si la localización celular de SH3TC2 requiere una miristoilación en N-terminal, se generó una construcción que carecía de los primeros 6 aminoácidos después de la primera metionina ($\Delta 2-6$).

Como se muestra en la **figura 14A**, y en el **Anexo III**, $\Delta 2-6$ pierde su patrón de membrana plasmática y no colocaliza con el marcador de Na,K ATPasa, y además muestra una localización citoplasmática difusa muy similar a la mostrada para Myc-SH3TC2 (**Fig. 13A**).

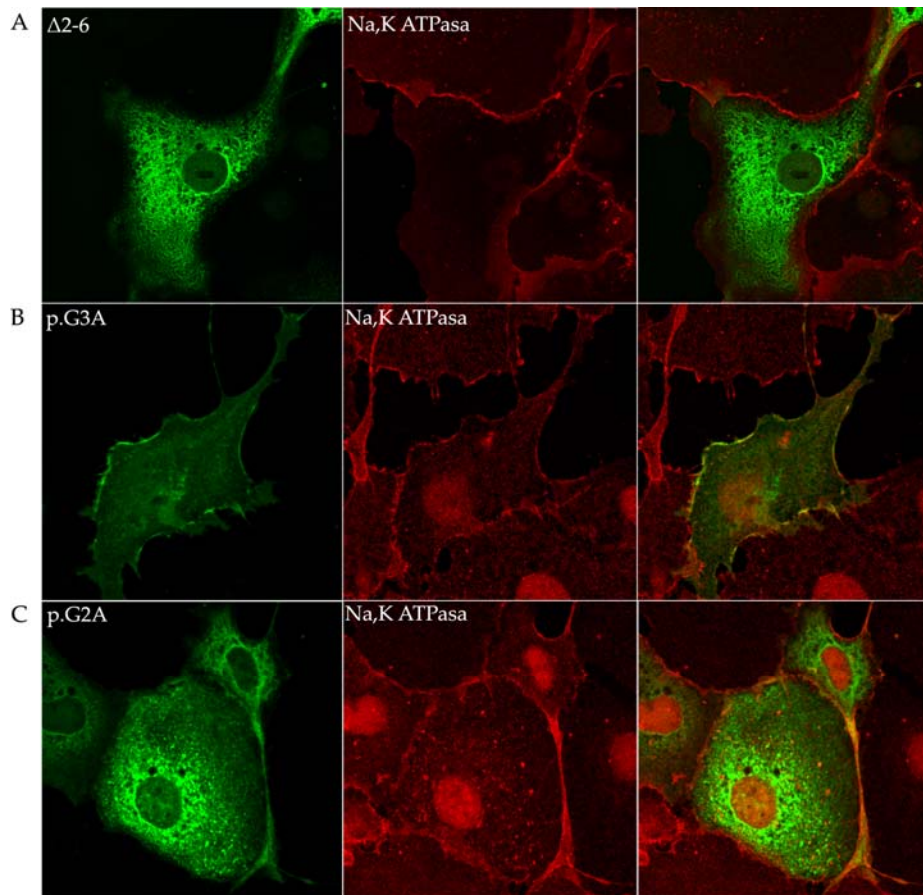


Fig. 14. Efecto de la miristoilación sobre la localización de SH3TC2. Células COS-7 se transfectaron con los plásmidos que codifican para proteínas mutadas de SH3TC2, etiquetadas con -HA: $\Delta 2-6$ (**A**); p.G3A (**B**); p.G2A (**C**). Tras la fijación, las células se inmunodetectaron con anti-HA para detectar las proteínas mutadas, y Na,K ATPasa como marcador de la membrana plasmática (**A-C**). La detección anti-HA se muestra en el canal verde, mientras que en el canal rojo se muestra el marcador de la membrana plasmática. En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

La glicina en la posición 2 es absolutamente necesaria para que la proteína se puedan miristoilar (Resh, 1999). SH3TC2 contiene dos glicinas, una en la posición 2 y otra en la posición 3, así que se mutaron independientemente ambas glicinas a alaninas, obteniendo así respectivamente las construcciones p.G2A y p.G3A. El análisis de localización subcelular mostró que, mientras p.G3A conservaba el mismo patrón de expresión que el de SH3TC2-HA (**Fig. 14B**), la localización de p.G2A resultó estar alterada, presentando un patrón idéntico al mostrado con $\Delta 2-6$ (**Fig. 14C**), y muy similar a Myc-SH3TC2 (**Fig. 13A**).

Estos resultados, además de demostrar que la proteína SH3TC2 sufre una N-miristoilación, necesaria para su localización celular, nos indican que el patrón de expresión perinuclear y de membrana plasmática de SH3TC2-HA es el correcto.

Los estudios de colocalización subcelular de SH3TC2 se realizaron en células COS-7 y HeLa, aunque su patrón de membrana plasmática y perinuclear, se confirmó en tres líneas de células de Schwann: RT4-D6P2T, SW10 y HEI-193 (**Fig. 15**)

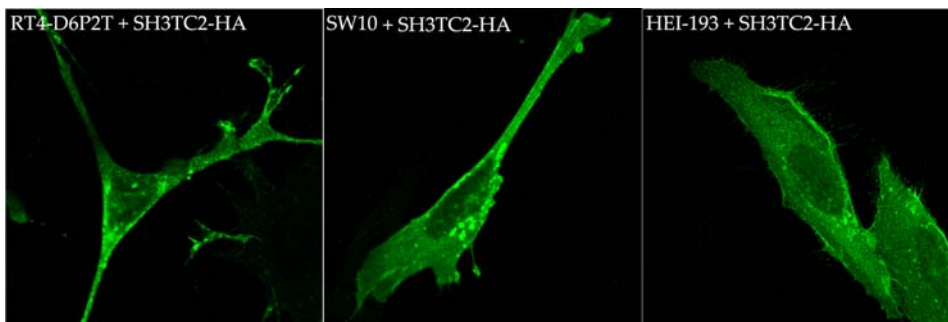


Fig. 15. Localización celular de SH3TC2 en líneas celulares de Schwann. El patrón de expresión de SH3TC2-HA, sobreexpresado en células RT4-D6P2T, SW10 y HEI-193, se analizó mediante inmunodetección con anti-HA (canal verde).

5. SH3TC2 colocaliza con componentes de la ruta endocítica

Los resultados anteriores muestran que SH3TC2-HA colocaliza con el marcador de membrana plasmática Na,K ATPasa, pero presenta también una localización punteada y perinuclear. Para entender cuál era la naturaleza de estas estructuras, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia doble, utilizando anticuerpos específicos de diferentes orgánulos citoplasmáticos, y el anticuerpo anti-HA para la detección de SH3TC2-HA (Materiales y Métodos – **Tabla 3**).

Los resultados obtenidos, muestran que SH3TC2-HA colocaliza con el marcador de endosomas tempranos EEA1 (**Fig. 16A; Anexo III**), de endosomas tardíos M6PR (**Fig. 16B; Anexo III**), y presenta también colocalización con el marcador de vesículas recubiertas de clatrina CHC (**Fig. 16C; Anexo III**), que está implicado en el tráfico vesicular entre la membrana plasmática, la ruta endocítica y la red del *trans*-Golgi (TGN).

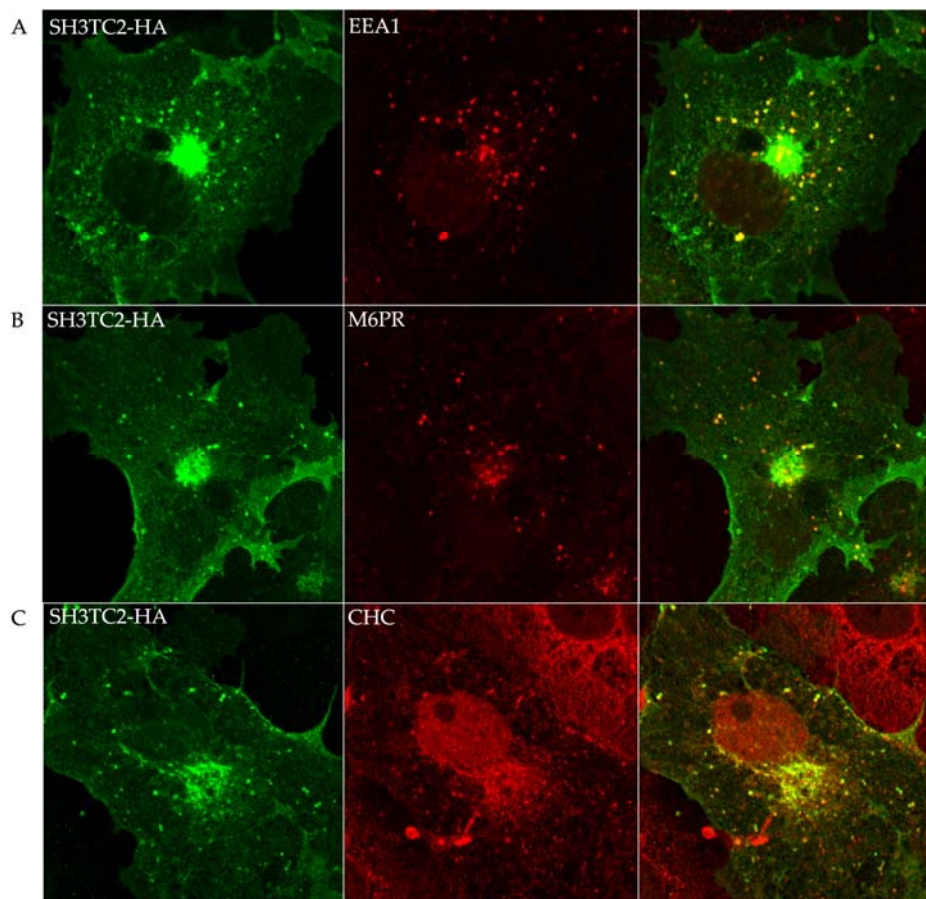


Fig. 16. Localización subcelular de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con el plásmido que codifica para SH3TC2-HA (A-C), se fijaron e inmunodetectaron con anti-HA para SH3TC2-HA, y con los siguientes marcadores de orgánulos: anti-EEA1 (A); anti-M6PR (B); anti-CHC (C). La detección de anti-HA se muestra en el canal verde, mientras que en el canal rojo se muestran los marcadores de orgánulos. En el panel derecho se muestra la colocalización, mediante la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

Además, se descartó la colocalización de SH3TC2-HA con el marcador de retículo endoplasmático GRP-94, de peroxisomas PMP70 o lisosomas LAMP1 (Fig. 17A-C).

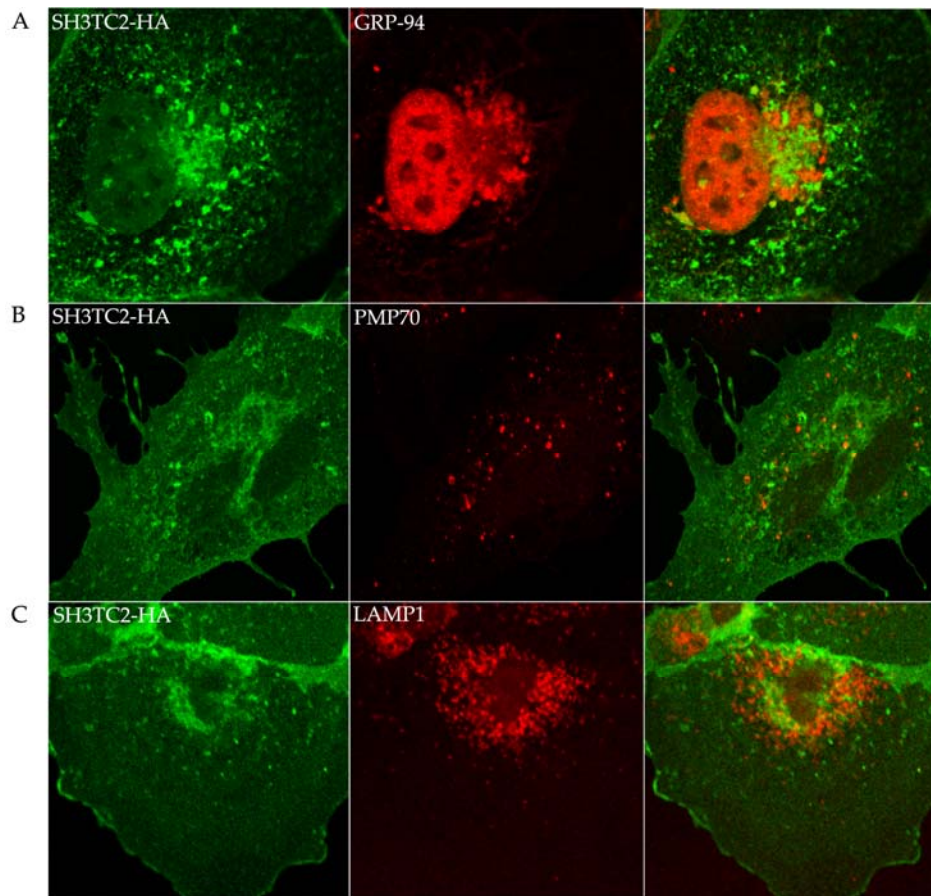


Fig. 17. Localización subcelular de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con el plásmido que codifica para SH3TC2-HA (A-C), se fijaron e inmunodetectaron con anti-HA para SH3TC2-HA, y con los siguientes marcadores de orgánulos: anti-GRP-94 (A); anti-PMP70 (B); anti-LAMP1 (C). La detección de anti-HA se muestra en el canal verde, mientras que en el canal rojo se muestran los marcadores de orgánulos. En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

Los estudios de colocalización con la construcción $\Delta 2-6$ mostraron que la proteína carente de la señal de miristoilación, no colocaliza con ninguno de los orgánulos relacionados con la ruta endocítica EEA1, M6PR y CHC (**Fig. 18; Anexo III**), confirmando que esta señal es imprescindible para la correcta localización de la proteína.

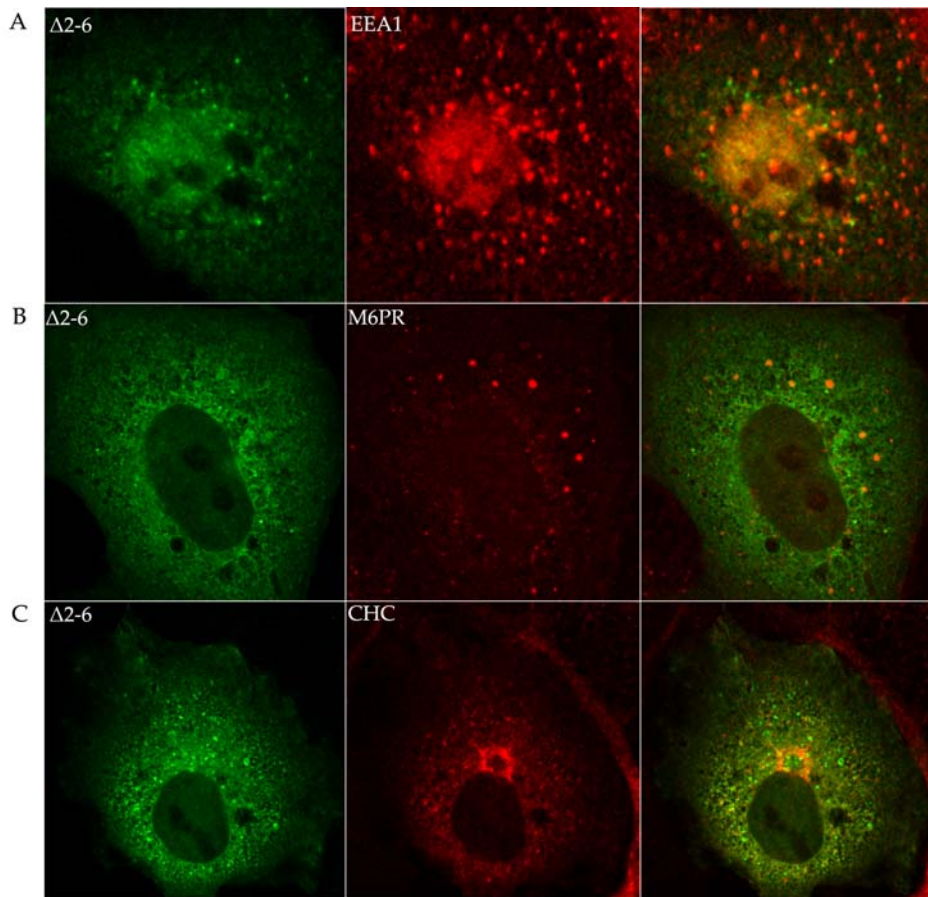


Fig. 18. Efecto de la miristoilación sobre la localización de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína no miristoilada $\Delta 2-6$ (A-C), se fijaron y inmunodetectaron con anti-HA para detectar $\Delta 2-6$ y con los siguientes marcadores de orgánulos: anti-EEA1 (A); anti-M6PR (B); anti-CHC (C). La detección de $\Delta 2-6$ se muestra en el canal verde, mientras que los marcadores de orgánulos se muestran en el canal rojo. En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

En conclusión, estos resultados sugieren que SH3TC2 podría desempeñar un papel en la ruta endocítica celular, y que su colocalización con cualquiera de los orgánulos de esta ruta depende de la señal de miristoilación.

6. Asociación de SH3TC2 con las membranas celulares

El grado de asociación de la proteína miristoilada (SH3TC2-HA) y no miristoilada ($\Delta 2-6$), se determinó analizando independientemente para cada una de las proteínas su capacidad de liberarse en la fase soluble.

El análisis mediante *Western blot* de las distintas fracciones demuestra que SH3TC2-HA no se encuentra en la fracción soluble, y que sólo una pequeña cantidad de la proteína se libera tras tratamiento con tampón de alto pH, pero no con alta fuerza iónica (**Fig. 9**).

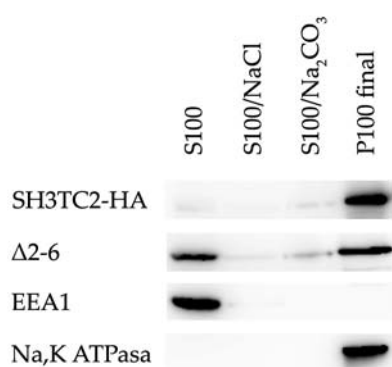


Fig. 19. Grado de asociación de SH3TC2 con las membranas celulares. Células de COS-7, transfectadas independientemente con SH3TC2-HA y $\Delta 2-6$, se lisaron y centrifugaron a 100,000 g para obtener una fracción soluble (S100), y un precipitado. Las proteínas asociadas a membranas, presentes en el precipitado, fueron extraídas con tampón de alta fuerza iónica (S100/NaCl) y posteriormente con tampón a alto pH (S100/Na₂CO₃). El precipitado final (P100 final) se solubilizó en tampón RIPA. Volúmenes equivalentes de las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE y analizaron por *Western blot* con anti-HA, anti-EEA1, y anti-Na,K ATPasa.

La **figura 19** muestra que la proteína EEA1, asociada débilmente a membranas, se libera en la fracción soluble, mientras que Na,K ATPasa, que es una proteína integral de membrana, presenta un patrón similar a SH3TC2. La asociación de SH3TC2 a membranas celulares es consecuentemente muy fuerte.

En cambio, parte de la proteína no miristoilada $\Delta 2-6$ se libera en la fracción soluble, y parte se queda unida a las membranas (**Fig. 19**), indicando que la asociación de ésta a las membranas no se debe exclusivamente a la miristoilación, sino que podría ser mediada también por interacciones con otras proteínas, probablemente a través de los dominios SH3 y/o TPR.

El análisis mediante *Western blot*, tras centrifugación en gradiente de sacarosa, muestra que la distribución subcelular de SH3TC2-HA se solapa mayoritariamente con el marcador de membrana plasmática Na,K ATPasa, y de manera más débil con el marcador de endosomas tempranos EEA1, y de endosomas tardíos Rab7 (**Fig. 20A-B**). Estos resultados confirman nuevamente la localización de SH3TC2 en la membrana plasmática y en componentes de la ruta endocítica.

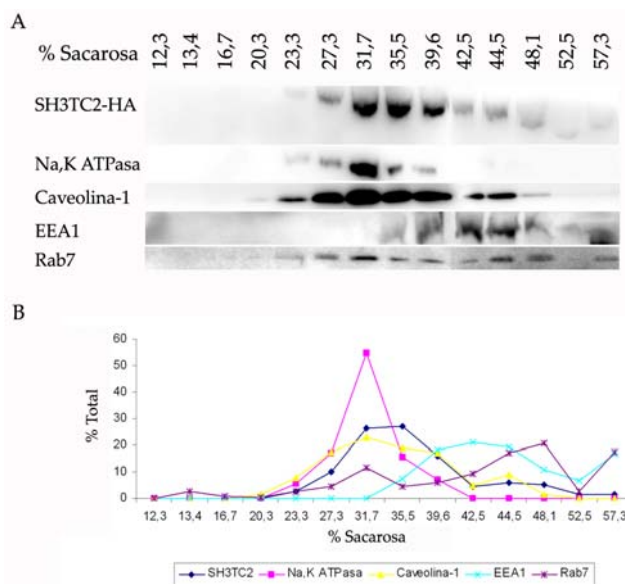


Fig. 20. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa. (A) Los extractos de membranas de células COS-7 o HeLa, transfectadas con SH3TC2-HA, se fraccionaron en un gradiente de sacarosa y analizaron mediante *Western blot* con anti-HA, anti-Na,K ATPasa, anti-Caveolina-1, anti-EEA1 y anti-Rab7. Arriba de cada fracción se especifica el porcentaje de sacarosa. (B) Distribución del porcentaje total de SH3TC2-HA y de los marcadores anti-Na,K ATPasa, anti-Caveolina-1, anti-EEA1 y anti-Rab7 en función de la concentración de sacarosa.

Es de resaltar también la fuerte asociación que se muestra entre SH3TC2 y el marcador de *lipid rafts*: caveolina-1, ya que ambas proteínas se concentran mayoritariamente en la misma fracción de sacarosa (**Fig. 20A-B**). Así que, mediante la técnica del gradiente de flotación investigamos la posible asociación de SH3TC2 a estos dominios de membrana.

Los resultados obtenidos muestran que SH3TC2-HA se libera parcialmente en las fracciones más ligeras, que corresponden a la fracción pura de *lipid rafts* (**Fig. 21**). La pureza del extracto queda confirmada por la presencia de la caveolina-1, que se concentra mayoritariamente en esta fracción.

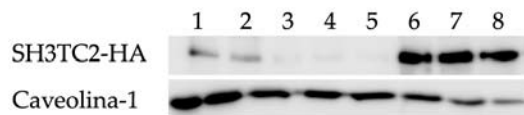


Fig. 21. Purificación de la fracción de *lipid rafts*, mediante gradiente de flotación. Los extractos de membranas

de células COS-7 o HeLa, transfectadas con SH3TC2-HA, se trataron con TX-100 y fraccionaron en un gradiente de flotación. Las fracciones desde densidad más baja, que se relaciona con los *lipid rafts* (carrera 1), hasta las de densidad más alta (carrera 8), se analizaron mediante *Western blot* con anti-HA y anti-caveolina-1.

7. Función biológica de los dominios SH3 y TPR

Los resultados previos demuestran que SH3TC2 está fuertemente asociada a las membranas y que necesita ser miristoilada para estar eficientemente localizada en las membranas celulares, si bien no se descarta que otros factores puedan participar en el anclaje de la proteína a membranas. Para ello, se generaron una serie de construcciones que presentaban deleciones de dominios concretos (**Fig. 22**).

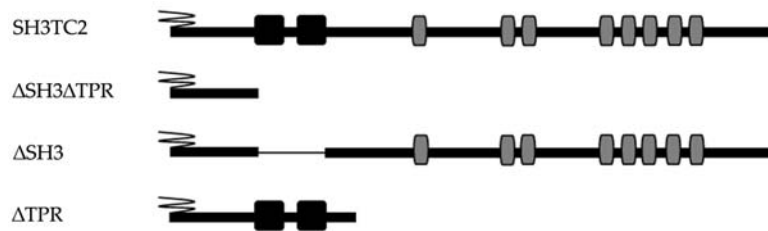


Fig. 22. Esquema representativo de las construcciones mutadas de SH3TC2. Los cuadrados ovalados y negros, representan los dominios SH3, mientras que los rectángulos ovalados y grises los dominios TPR. La línea espiral representa el dominio de miristoilación. La delección generada se muestra con una línea recta y fina. Todas estas variantes de SH3TC2, estaban etiquetadas con el epitopo -HA en el extremo C-terminal.

Los resultados de inmunofluorescencia indican lo siguiente: Δ SH3 Δ TPR, una proteína truncada que carece de los dominios SH3 y TPR, y que conserva sólo los primeros 180 aminoácidos, y por tanto contiene la señal de miristoilación, no colocalizaba ni con la membrana plasmática, ni con las vesículas del TGN, y presentaba un patrón punteado citoplasmático que colocalizaba de forma parcial con los endosomas tempranos y los endosomas tardíos (**Fig. 23A-D**). Ambas construcciones que presentaban deleciones o de los dos dominios SH3 (Δ SH3), o bien de todos los dominios TPR (Δ TPR), mantenían una localización similar a la de la proteína completa SH3TC2-HA (**Anexo IV-1 y IV-2**).

Todos estos resultados, parecen indicar que tanto los dominios SH3 como los TPR, en combinación con la miristoilación son suficientes para permitir que SH3TC2 alcance su localización correcta.

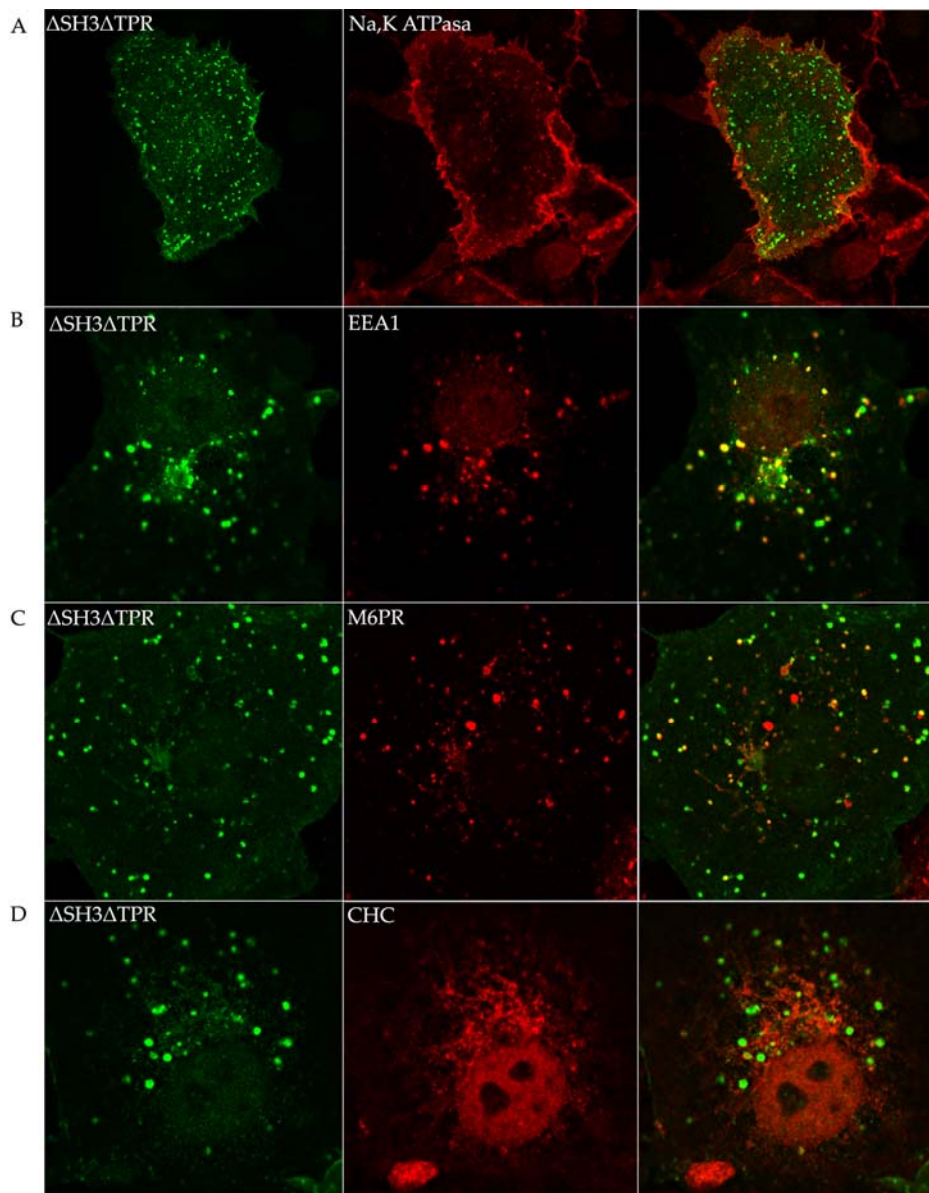


Fig. 23. Efecto de la delección de los dominios SH3 y TPR sobre la localización de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con Δ SH3 Δ TPR. Tras la fijación, las células se inmunodetectaron con anti-HA (**A-D**, canal verde), y uno de los siguientes marcadores de orgánulos (canal rojo): anti-Na,K-ATPasa (**A**), anti-EEA1 (**B**), anti-M6PR (**C**), y anti-CHC (**D**). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales

8. Estudio de mutaciones descritas en pacientes afectados de CMT4C

Nuestro objetivo inmediato fue examinar lo que ocurría con la localización celular de la proteína, tras introducir independientemente mutaciones patológicas de CMT4C. Por ello, testamos los efectos de las mutaciones que habían sido identificadas en nuestra serie de pacientes y en nuestro laboratorio, y otras ya descritas previamente por otros autores (Fig. 24).

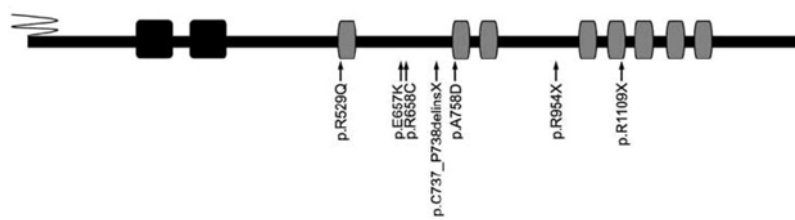


Fig. 24. Esquema representativo de las mutaciones patológicas de SH3TC2 analizadas en este trabajo. Las flechas negras indican la posición de la mutación en la proteína.

Las tres mutaciones con pérdida de sentido, p.C737_P738delinsX, p.R954X, y p.R1109X, y la p.A758D, presentaban el mismo patrón de expresión que la proteína completa SH3TC2. En cambio, las otras tres mutaciones con cambio de sentido, p.R529Q, p.E657K, y p.R658C, presentaban un patrón diferente. El cambio más evidente se observó con la mutación p. R529Q, que presentaba una localización variable. En algunos casos, su distribución era similar a SH3TC2, pero un alto porcentaje de células mostraban una localización anormal. Mayoritariamente se observó una fuerte reducción o ausencia del patrón de membrana plasmática (Fig. 25A), una ausencia completa en las vesículas citoplasmáticas (Fig. 25B-C), y una expresión variable a nivel del TGN (Fig. 25D).

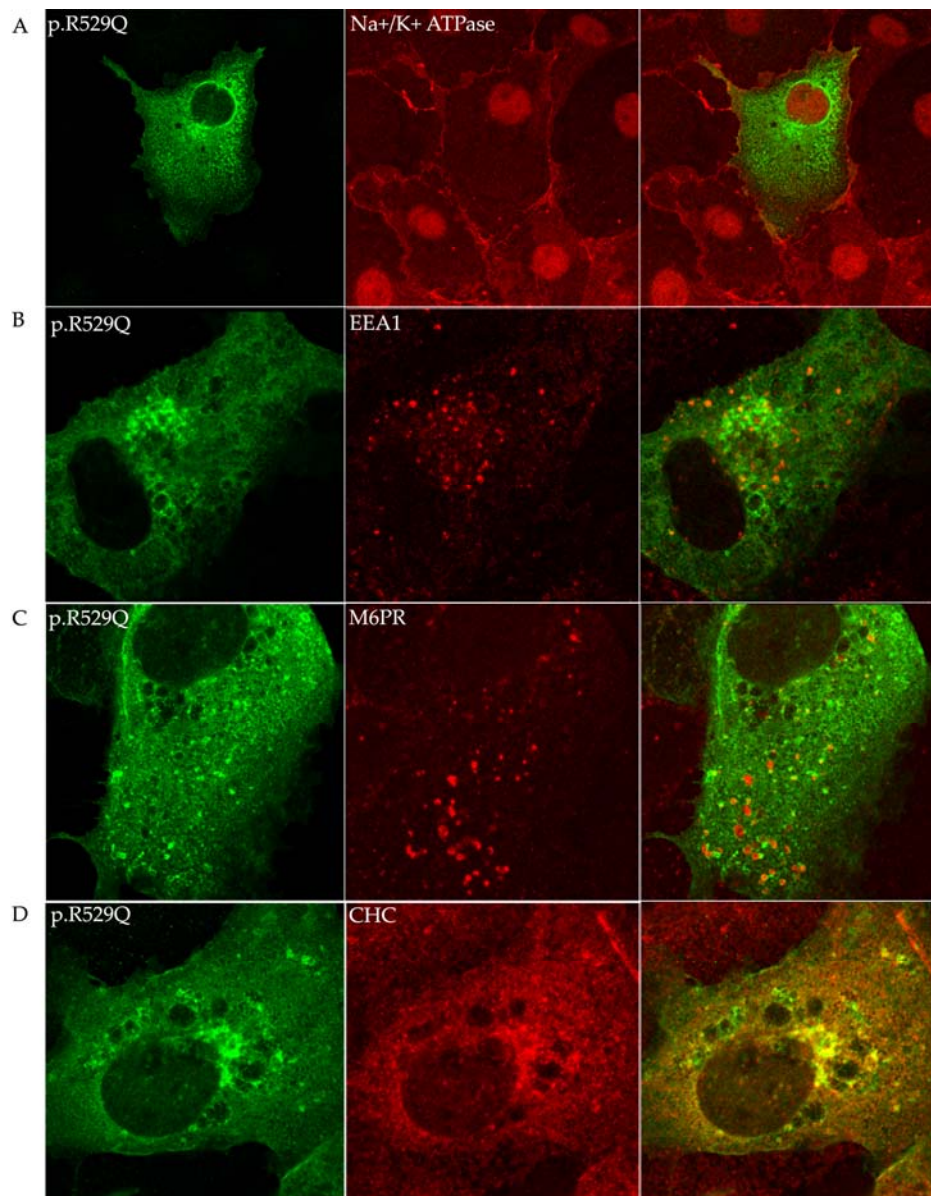


Fig. 25. Efecto de las mutaciones p.R529Q sobre la localización de SH3TC2. p.R529Q, fue sobreexpresada en células de COS-7, e inmunodetectada con anti-HA (A-D, canal verde). Además, anti-Na,K ATPasa (A), anti-EEA1 (B), anti-M6PR (C), y anti-CHC (D), se usaron como marcadores de orgánulos (canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

Las mutaciones p.E657K y p.R658C, presentaban un patrón de expresión similar a la de p.R529Q, aunque su patrón de TGN era más marcado (**Anexo V-1 y V-2**).

La similitud en la localización de estas tres proteínas mutantes sugiere que esta región, que incluye el primer dominio TPR (TPR1), es importante para la localización de SH3TC2. Para abordar esta cuestión, se generó una construcción que incluía sólo la región del dominio TPR1, fusionado a un fragmento de proteína N-terminal que carecía de los dominios SH3 y cualquier otro dominio TPR, nombrado myr-TPR1 (**Fig. 26**).

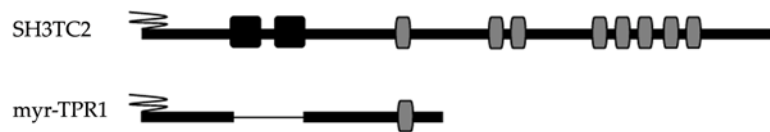


Fig. 26. Esquema representativo de la construcción mutada myr-TPR1. Los cuadrados ovalados y negros, representan los dominios SH3, mientras que los rectángulos ovalados y grises los dominios TPR. La línea espiral representa el dominio de miristoilación. La deleción generada se muestra con una línea recta fina. Esta variante de SH3TC2 estaba etiquetada con el epitopo -HA en el extremo C-terminal.

De esta forma se demostró que esta construcción es capaz de localizar con las mismas estructuras que se asocian a la proteína completa (**Fig. 27**). En definitiva, el primer dominio TPR, junto con el dominio de miristoilación, serían suficientes para que la proteína se dirija a su correcta localización.

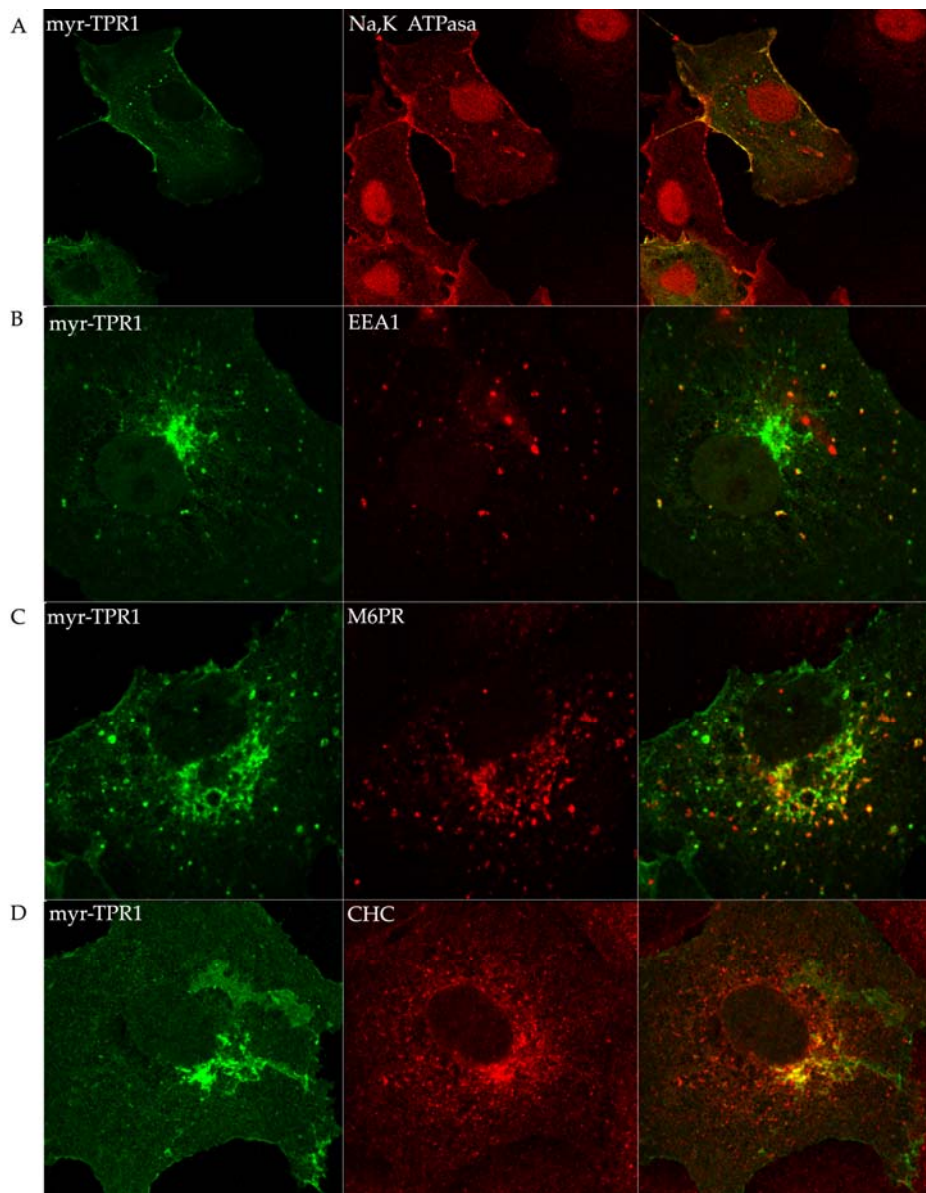


Fig. 27 Localización de la proteína mutada myr-TPR1. Células COS-7, transfectadas con myr-TPR1. Tras la fijación, las células se inmunodetectaron con anti-HA (**A-D**, canal verde), y uno de los siguientes marcadores de orgánulos (canal rojo): anti-Na,K-ATPasa (**A**), anti-EEA1 (**B**), anti-M6PR (**C**), y anti-CHC (**D**). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

CAPÍTULO II

“Un defecto en la ruta de señalización Nrg1/ErbB, podría ser la causa del fenotipo hipomielinizante temprano en los ratones *Sh3tc2*^{-/-}”

1. Expresión temporal de *Sh3tc2* en nervio ciático de ratón

Los múltiples factores que regulan la mielinización de los nervios periféricos, presentan un perfil de expresión muy variable a lo largo del desarrollo de la mielina (Verheijen et al., 2003, Nagarajan et al., 2002). Con el fin de determinar la expresión temporal de *Sh3tc2* durante el desarrollo de la mielina, analizamos los niveles de mRNA de *Sh3tc2* a partir de extractos de nervio ciático de ratón de distintas edades, desde estado embrionario (E17) hasta edad adulta (P56). Los datos mostrados en la **figura 28**, indican que *Sh3tc2* se expresa tanto durante la fase embrionaria (E17), como durante la fase de desarrollo post-natal de la mielina (P0-P10), en la que aumenta levemente su expresión alcanzando un nivel máximo que se mantiene en la fase adulta.

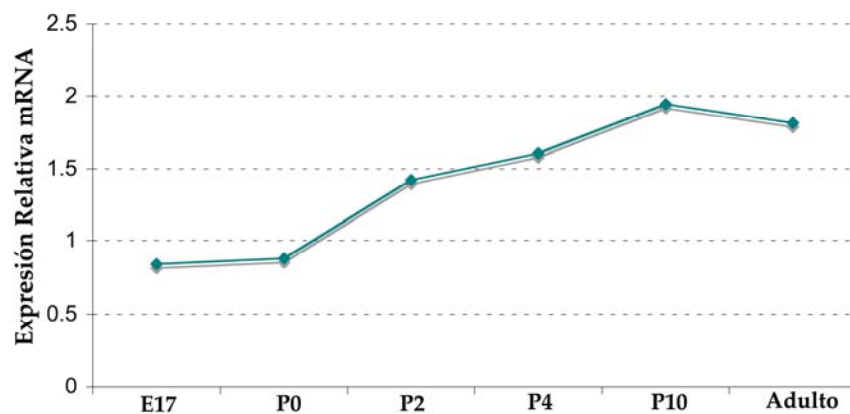


Fig. 28. Expresión temporal de *Sh3tc2* en nervio ciático de ratón. El RNA de *Sh3tc2* procedente de nervio ciático de ratones de distintas edades (embrionario: E17; post-natal: P0-P10; adulto-P56), se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos se normalizaron frente a *Gapdh* y *Ubiquitina*.

2. Los ratones *Sh3tc2*^{-/-} presentan un fenotipo hipomielinizante con aparición muy temprana

El análisis morfométrico, mediante microscopía electrónica del número de capas de mielina que envuelven los axones de los nervios ciáticos de ratones WT y KO de *Sh3tc2* (*Sh3tc2*^{-/-}), indica que el proceso de hipomielinización cursa con una aparición muy temprana (Fig. 29).

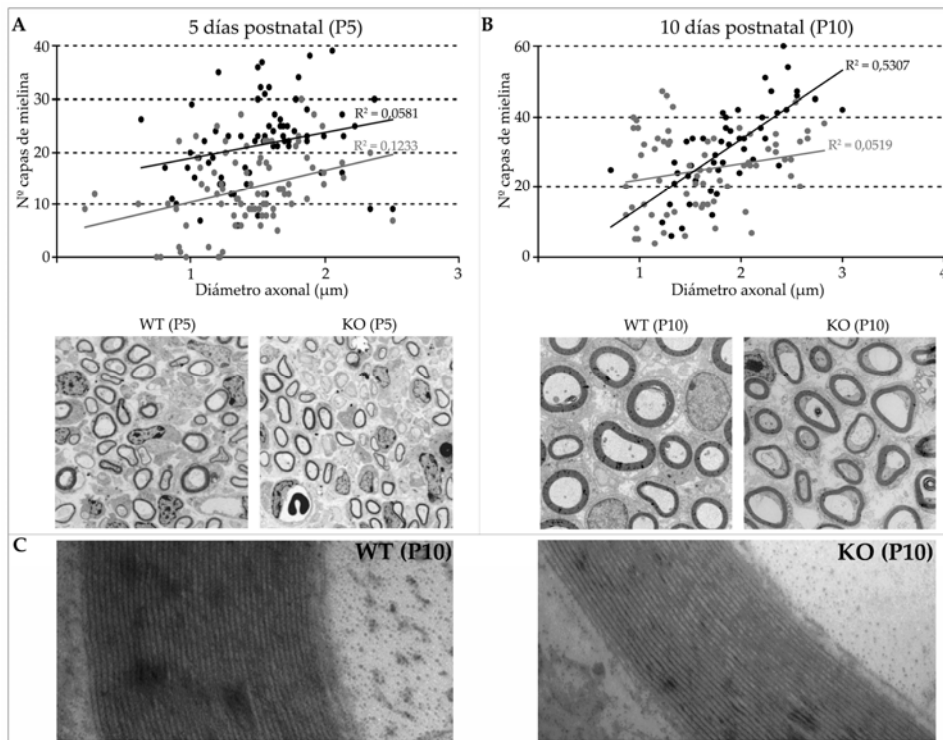


Fig. 29: Análisis histopatológico en cortes ultrafinos de nervio ciático de ratones WT y KO de *Sh3tc2*. Los gráficos muestran el análisis morfométrico realizado mediante cuantificación del número de capas de mielina a partir de imágenes tomadas por microscopía electrónica, en ratones P5 (A), y P10 (B). (C) Imágenes de microscopía electrónica donde se aprecia la disminución del número de capas de mielina en los ratones P10 *Sh3tc2*^{-/-}, respecto al WT. En los gráficos la línea y los puntos negros representan el WT, mientras que la línea y los puntos grises el KO de *Sh3tc2*.

Los gráficos correspondientes al estudio llevado a cabo en ratones P5, muestran que tanto en los WT como en los KO la formación de la mielina en relación con el diámetro axonal siguen una misma progresión, si bien en el KO se evidencia una menor formación de las capas de mielina, lo que sugiere que ya en esta fase hay un fenotipo hipomielinizante (**Fig. 29A**). La deficiencia de mielinización se hace más notable con el crecimiento del ratón, apreciándose diferencias relevantes entre los ratones *Sh3tc2^{+/+}* y *Sh3tc2^{-/-}* a P10 (**Fig. 29B-C**).

En su conjunto, estos resultados demuestran que el establecimiento de la patología en los ratones deficientes de *Sh3tc2* ocurre en una fase muy temprana de desarrollo de la mielina.

3. La ruta de señalización Nrg1/ErbB está alterada en ratones *Sh3tc2^{-/-}*

El análisis de los niveles de expresión de los componentes principales de la ruta Nrg1/ErbB se llevó a cabo mediante *Western blot*, a partir de extractos proteicos de *endoneurium* de nervio ciático de ratones *Sh3tc2^{+/+}* y *Sh3tc2^{-/-}* de distintas edades (P2, P5, P15).

El análisis comparativo de los niveles totales de Nrg1, ErbB2 y ErbB3 no revela diferencias de expresión entre el WT y el KO. Sin embargo, los niveles fosforilados de ambos receptores, p-ErbB2 y p-ErbB3, están aumentados en el KO y sólo en edades tempranas post-natales (P2 y P5) (**Fig. 30A-B**). El análisis estadístico mostrado en los gráficos indica que la fosforilación de ErbB2 está aumentada de forma significativa a la edad de 5 días (P5), y la de ErbB3 lo está a los 2 días de vida (P2). Cabe también señalar que los niveles de fosforilación de p-ErbB2 y de p-ErbB3 en el KO muestran una tendencia notable al aumento a P2 y a P5 respectivamente, que estadísticamente no es significativa. Por último, a P15 no se aprecian diferencias significativas, entre el WT y el KO, en el estado de fosforilación de ambos receptores (**Fig. 30B**).

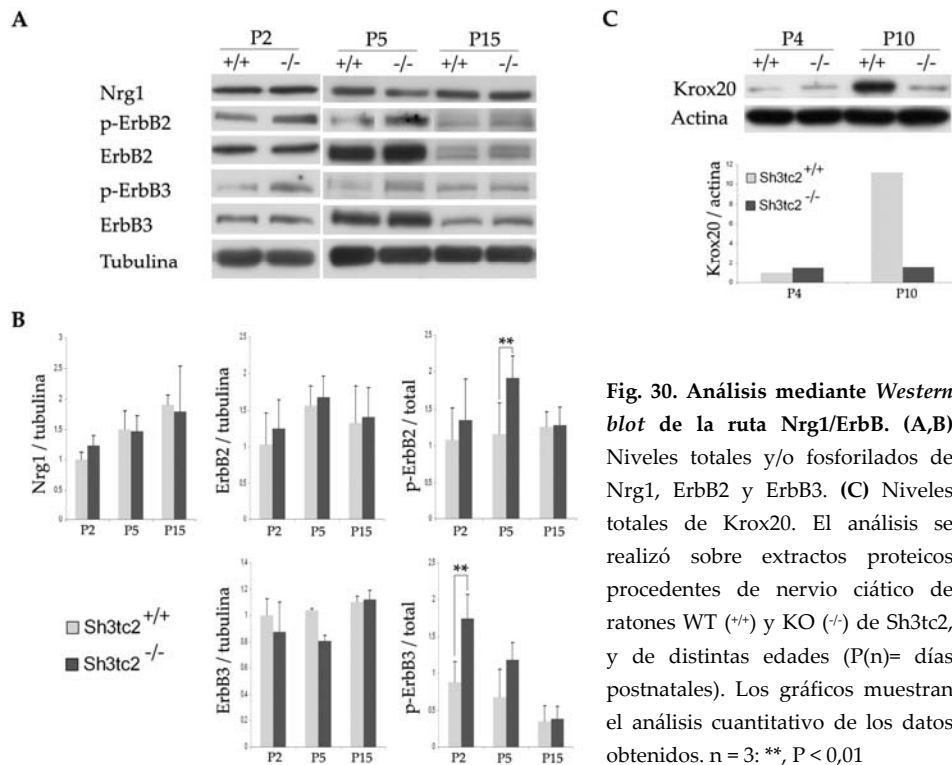


Fig. 30. Análisis mediante Western blot de la ruta Nrg1/ErbB. (A,B) Niveles totales y/o fosforilados de Nrg1, ErbB2 y ErbB3. **(C)** Niveles totales de Krox20. El análisis se realizó sobre extractos proteicos procedentes de nervio ciático de ratones WT (+/) y KO (-) de Sh3tc2, y de distintas edades (P(n)= días postnatales). Los gráficos muestran el análisis cuantitativo de los datos obtenidos. n = 3; **, P < 0,01

Respecto a Krox20, un factor de transcripción que regula los genes implicados en los proceso de mielinización durante el desarrollo de los nervios periféricos, se observó una disminución notable de su expresión a P10 (**Fig. 30C**).

Los resultados sugieren que la deficiencia de Sh3tc2 alteraría el estado de activación de la ruta de señalización Nrg1/ErbB y consecuentemente, la actividad reguladora del factor de transcripción Krox20 se vería también afectada disminuyendo su expresión en una etapa principalmente mielinizante para la célula de Schwann.

4. SH3TC2 colocaliza con el receptor ErbB2 en la membrana plasmática

El análisis mediante inmunofluorescencia en células HeLa, co-transfectadas con SH3TC2-HA y ErbB2-FLAG, demuestra que existe una evidente colocalización entre SH3TC2 y el receptor ErbB2 principalmente en la membrana plasmática (**Fig. 31A-B**).

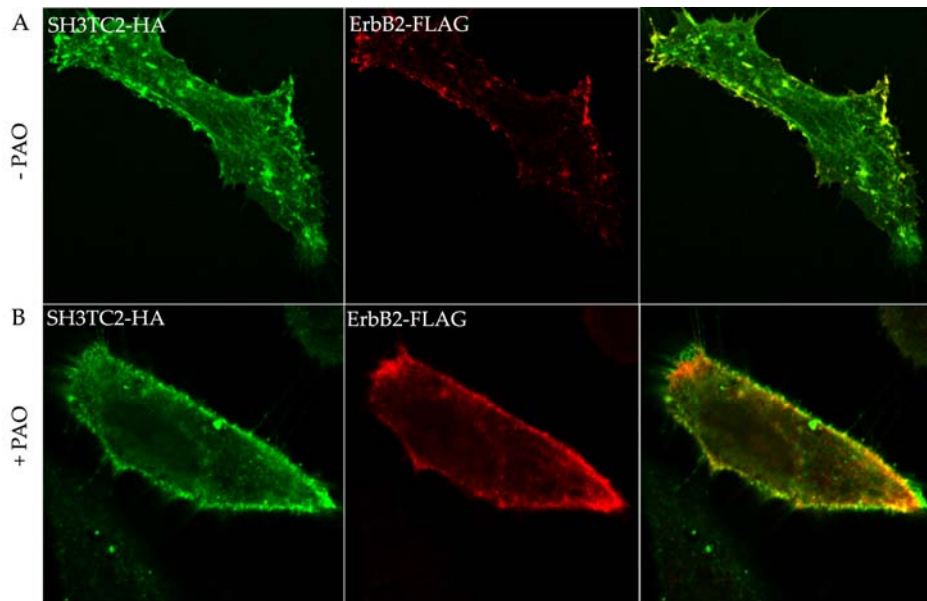


Fig. 31. Efecto de PAO sobre la localización de ErbB2 y SH3TC2. Células HeLa, co-transfectadas con SH3TC2-HA y ErbB2-FLAG, no tratadas (**A**) o tratadas (**B**) con PAO. Tras la fijación, las células se inmunodetectaron con anti-HA (canal verde) y anti-FLAG (canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

PAO inhibe la internalización de los receptores ErbB (Bild et al., 2002, Yang et al., 2005). Tras 30 min de tratamiento con PAO, SH3TC2-HA pierde su localización perinuclear y la proteína se concentra exclusivamente en la membrana plasmática. La superposición de los patrones de expresión de SH3TC2 y ErbB2, muestra como ambas proteínas se solapan exclusivamente a nivel de la membrana plasmática bajo el efecto de PAO (**Fig. 31A-B**).

El análisis mediante inmunofluorescencia del marcador de endosomas tempranos EEA1 en presencia de PAO nos mostró que la morfología de las vesículas endocíticas no parece estar afectada (**Fig. 32**).

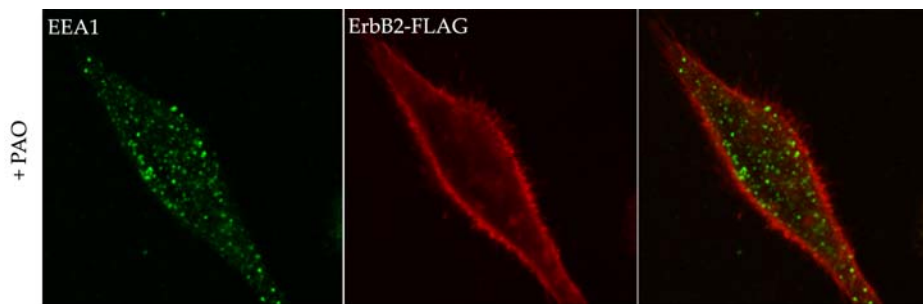


Fig. 32. Efecto de PAO sobre la formación de los endosomas tempranos. Células HeLa, co-transfectadas con SH3TC2-HA y ErbB2-FLAG, y tratadas con PAO. Tras la fijación, las células se inmunodetectaron con anti-EEA1 (canal verde) y anti-FLAG (canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

5. SH3TC2 podría estar involucrada en el proceso de internalización de ErbB2

Con el fin de estudiar la asociación entre SH3TC2 y ErbB2 durante el proceso de internalización de este receptor, se empleó la técnica de *antibody feeding*, que nos permite marcar *in vivo* ErbB2-FLAG cuando la endocitosis está bloqueada (4°C), y posteriormente tener un seguimiento de este receptor durante su internalización a 37°C.

La **figura 33** muestra como SH3TC2 y ErbB2 colocalizan en la superficie de la membrana plasmática a $t=0$, cuando la endocitosis está aún bloqueada. Durante el proceso de internalización, a $t=5$ se observa colocalización entre ambas proteínas en vesículas de internalización. Tras 15-30 min, la mayoría de las células muestran un patrón vesicular de ErbB2, debido a su internalización, que en su mayoría colocalizan con las vesículas que contienen SH3TC2.

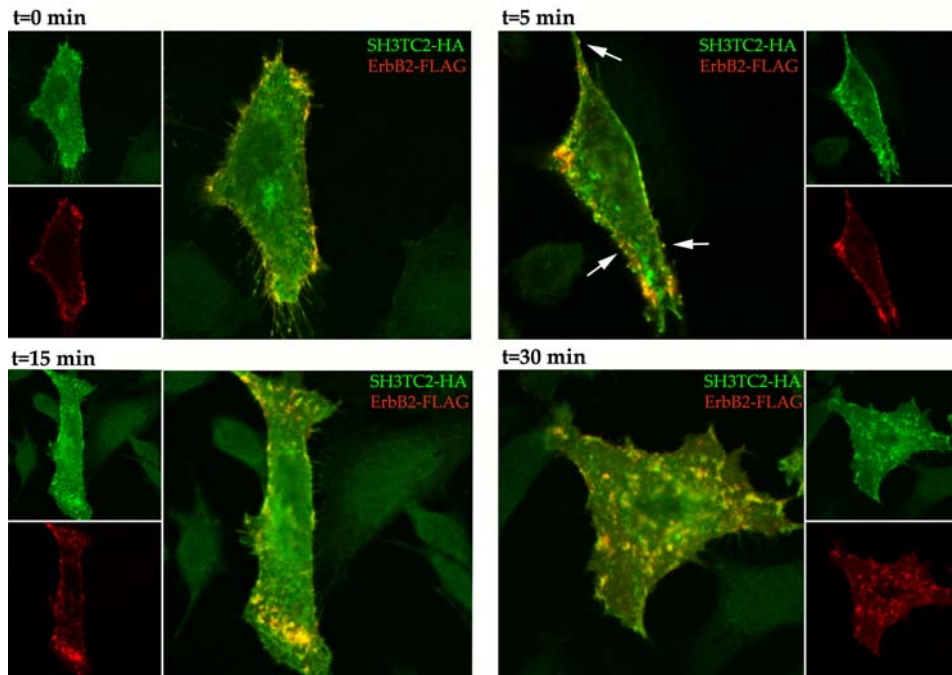


Fig. 33. Análisis de la internalización de ErbB2 y su asociación con SH3TC2 mediante la técnica de *antibody feeding*. Células HeLa, co-transfectadas con SH3TC2-HA y ErbB2-FLAG. ErbB2-FLAG se marcó *in vivo* con el anticuerpo anti-FLAG (canal rojo) durante 30 min a 4°C. Tras la fijación a los tiempos de inducción indicados (t=0, t=5, t=15 y t=30; t=min), SH3TC2-HA se detectó con anti-HA (canal verde). En amarillo se muestra la colocalización entre ambas proteínas.

Con el fin de analizar si SH3TC2 afecta el grado de internalización de ErbB2, analizamos la expresión de ErbB2 en células HeLa transfectadas con SH3TC2-HA. Tras inducción con Nrg1, la internalización de ErbB2 se incrementa con el tiempo (t=0, 15, 30). Al sobreexpresar SH3TC2-HA, la internalización de ErbB2 aumenta, con una diferencia respecto al caso control no transfectado que se revela estadísticamente significativo a los 30 min de inducción (t=30) (Fig. 34A-B).

Capítulo II. Resultados

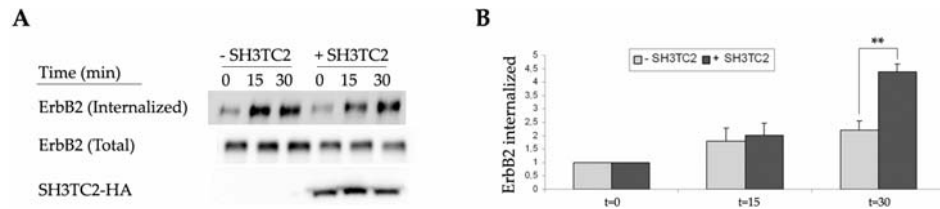


Fig. 34. Análisis del grado de internalización de ErbB2. (A) Células HeLa, transfectadas con SH3TC2-HA y no transfectadas, se biotinilaron con *Sulfo-NHS-SS-biotin* a 4°C, y posteriormente se incubaron a 37°C con Nrg1 (10 nM). A continuación, ErbB2 total e internalizado se analizó a diferentes tiempos (0, 15, 30 min). (B) Análisis cuantitativo de los datos obtenidos en (A). n = 3; ** = p < 0,01.

En su conjunto, estos resultados sugieren que una deficiencia de SH3TC2 sería responsable de una alteración en el proceso de internalización de los receptores ErbB, lo que provocaría una desregulación de la ruta Nrg1/ErbB, y consecuentemente el desarrollo temprano de la mielina se vería también afectado.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

“Mutaciones patológicas de *SH3TC2* alteran la localización de la proteína en la membrana plasmática y en orgánulos de la ruta endocítica”

La neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la neuropatía hereditaria más común con una frecuencia estimada de 28/100.000 (Skre, 1974, Combarros et al., 1987). Se trata de una enfermedad rara extremadamente heterogénea desde el punto de vista clínico y genético, que cursa principalmente con una atrofia y debilidad muscular progresiva distal, y con pérdida de la sensibilidad en las extremidades. Hasta la fecha, el CMT ha sido asociado a más de 30 genes distintos, que codifican para proteínas con un amplio espectro de funciones celulares.

La forma CMT4C es debida a mutaciones en el gen *SH3TC2* (Senderek et al., 2003a). Los pacientes afectados de CMT4C presentan principalmente un fenotipo desmielinizante de los nervios periféricos, sugiriendo que el principal defecto ocurre durante la formación y/o mantenimiento de la mielina.

En un trabajo colaborativo con el servicio de Neurología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, en una serie de pacientes de etnia gitana afectados de la enfermedad por CMT, se determinó que la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* es la causa más frecuente de CMT en población gitana en nuestro país (Claramunt et al., 2007). Recientemente, un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, en una serie de familias españolas que cursaban con un cuadro clínico de CMT desmielinizante, nos mostró la importancia de incluir *SH3TC2* en el diagnóstico genético, dado su relativa frecuencia en este grupo de pacientes (Martínez-Rubio D. et al., 2010). Estos hallazgos explican el interés surgido en el estudio de la proteína codificada por el gen *SH3TC2*. También en otras series, CMT4C representa una de las formas más comunes de CMT desmielinizante recesivo (Lassuthova et al., 2011, Azzedine et al., 2006, Houlden et al., 2009, Lupski et al., 2010).

SH3TC2 se expresa en la célula de Schwann

La isoforma humana de *SH3TC2* se expresa en varios tejidos neurales, aunque el transcrito más largo parece detectarse mayoritariamente en nervios periféricos, y en particular en nervio ciático (Senderek et al., 2003a). En ratones, nuestro análisis de expresión indica que *Sh3tc2* se expresa tanto en tejido neural, como en tejidos no neurales (**Fig. 11**). Recientemente, el análisis de expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real, confirmó la presencia de *Sh3tc2* en tejidos no neuronales, aunque los resultados obtenidos demuestran que su expresión es prácticamente específica de los nervios periféricos (Arnaud et al., 2009). Además, el análisis de expresión de GFP bajo el promotor de *Sh3tc2*, sugiere que sólo las células de Schwann son capaces de expresar la proteína Sh3tc2 (Arnaud et al., 2009). Este hallazgo explica el resultado obtenido en nuestro análisis de expresión en diferentes líneas celulares, en el que se detectó *Sh3tc2* exclusivamente en líneas celulares de Schwann (RT4-D6P2T, SW10 y HEI-193).

Partiendo de la premisa que *SH3TC2* se expresa específicamente en la célula de Schwann, es de esperar que cualquier mutación en esta proteína podría alterar la fisiología de la célula de Schwann y consecuentemente afectar la formación de la mielina. Respecto a la expresión de *Sh3tc2* en otros tejidos, no hay correlación alguna con la fisiopatología de la enfermedad, debido a que los pacientes padecen una afectación primaria de los nervios periféricos. Las manifestaciones clínicas adicionales (ej. nistagmo, sordera, etc.), no son coincidentes en todos los pacientes. La expresión de *Sh3tc2* en otros tejidos, podría ser debido a la existencia de otros productos de *splicing* alternativos y/o a la forma completa no funcional para la fisiología del tejido en cuestión.

SH3TC2, tras ser N-miristoilada, se localiza en la membrana plasmática y en vesículas de la ruta endocítica.

En primer lugar, clonamos el cDNA humano de SH3TC2, para así poder llevar a cabo los estudios realizados en este trabajo de tesis doctoral. Así pues, con el objetivo de determinar la función biológica de SH3TC2, se procedió al estudio de localización subcelular mediante sobreexpresión de la proteína. Estudios preliminares *in silico* sugerían que SH3TC2 podría ser una proteína citoplasmática asociada a cualquier tipo de membrana: plasmática, relacionada con un orgánulo específico del citoplasma, o incluso con la membrana nuclear.

Nuestros resultados demuestran que SH3TC2 se localiza en la membrana plasmática y en la región perinuclear de la célula (**Fig. 13**). En particular, SH3TC2 colocaliza con distintas vesículas de la ruta endocítica: endosomas tempranos, endosomas tardíos y vesículas recubiertas de clatrina en la zona del *trans*-Golgi (**Fig. 16**). Mediante ensayos de fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa, se confirmó nuevamente la localización de la proteína SH3TC2 en la membrana plasmática y en vesículas de la ruta endocítica (**Fig. 20**). Además, hemos demostrado que para poderse anclar a todas las membranas celulares de destino, SH3TC2 necesita ser N-miristoilada en la glicina 2 (**Fig. 14**), tal y como ya ha sido descrito para muchas otras proteínas (Resh, 1999).

El estudio de localización subcelular y los ensayos de colocalización se realizaron en células HeLa y COS-7. Debido a la fuerte asociación entre SH3TC2 y la célula de Schwann, se decidió confirmar el patrón de expresión observado en otras líneas celulares procedentes de células de Schwann: RT4-D6P2T, SW10 y HEI-193. Los resultados obtenidos, muestran que en estas tres líneas de origen glial, la localización subcelular de SH3TC2 es idéntica a la identificada en HeLa y COS-7 (**Fig. 15**).

Posteriormente a nuestros hallazgos (Lupo et al., 2009), se ha demostrado que SH3TC2 necesita estar N-miristoilada para anclarse a la membrana plasmática (Arnaud et al., 2009), y que interacciona con Rab11, relacionando la localización perinuclear de SH3TC2 con el compartimiento endocítico de reciclaje (Roberts et al., 2010, Stendel et al., 2010).

La fuerte asociación de SH3TC2 con las membranas celulares depende tanto de la N-miristoilación como de los dominios SH3 y TPR

Caveolina-1 es el mayor componente de las caveolas, invaginaciones de membrana ricas en colesterol, esfingolípidos, pero también se asocia a los *lipid rafts*, microdominios de membrana ricos en colesterol, esfingolípidos y moléculas de señalización. Aunque el mayor papel de las caveolas es el tráfico vesicular y del colesterol, recientemente se han identificado varias moléculas de señalización en las caveolas y la interacción funcional entre éstas y la caveolina-1 sugiere una posible participación de los *lipid rafts* en las rutas de señalización mediadas por proteínas transmembrana (Mikol et al., 2002). Los resultados obtenidos en el ensayo de fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa, en los que se observó una fuerte asociación entre SH3TC2 y caveolina-1, nos condujeron al análisis de la posible asociación de SH3TC2 con la fracción pura de los *lipid rafts*. Además, los ensayos de inmunofluorescencia muestran una localización de SH3TC2-HA con la membrana plasmática no homogénea, sino más bien enriquecida en algunas áreas. El análisis de *Western blot* demuestra que SH3TC2-HA está parcialmente asociada a la fracción pura de *lipid rafts* (Fig. 21)

Considerando la importancia de la N-miristoilación para la localización correcta de SH3TC2, su parcial asociación a dominios de membrana ricas en colesterol, junto con la presencia de los dominios SH3 y TPR, nos planteamos la hipótesis de que SH3TC2 podría estar implicada en la formación de complejos multiproteicos asociados a membranas celulares. Los estudios bioquímicos muestran que la

asociación de SH3TC2 con las membranas celulares es muy fuerte, ya que ésta no se libera en la fase soluble tras tratamiento con tampones de alta fuerza iónica y alto pH. En cambio, la proteína no miristoilada ($\Delta 2-6$) se libera en gran porcentaje en la fase soluble, aunque casi la mitad se queda retenida con las membranas celulares, sugiriendo que la asociación de SH3TC2 a las membranas no debe ser exclusiva de la miristoilación, sino que podría ser mediada también por interacciones con otras proteínas a través de los dominios SH3 y/o TPR.

Los dominios SH3 y/o SH2 son habituales en las proteínas adaptadoras que modulan procesos muy dinámicos como por ejemplo la señalización celular. Mediante estos dominios, las proteínas adaptadoras controlan la oligomerización de los receptores de membrana para la formación de complejos, la localización subcelular y la duración de un proceso celular (Pawson, 2007). Los dominios SH3 están también implicados en la interacción entre proteínas en la endocitosis de vesículas sinápticas (McPherson, 1999). La proteína adaptadora Grb2 entre otras, media la formación del complejo multiproteico EGFR/Sos/Grb2 para la activación de la ruta de señalización Ras en un mecanismo dependiente de sus dominios SH2/SH3 (Buday, 1999). Así mismo los dominios SH3 se han definido como péptidos muy versátiles, capaces de interactuar con múltiples proteínas y con una variedad muy amplia de procesos celulares (Kaneko et al., 2008). Los dominios TPR están implicados en el transporte de proteínas, y en muchos otros procesos celulares mediante la interacción con otras proteínas (Blatch and Lassle, 1999, D'Andrea and Regan, 2003).

Respecto a la N-miristoilación, ésta se considera una modificación importante también en la transducción de la señal intracelular. Una gran variedad de proteínas que se miristoilan toman parte en la transducción de la señal entre las membranas y el compartimiento intracelular (Hayashi and Titani, 2010). Sin embargo, esta modificación co- o post-traduccional no es suficiente para que la proteína se mantenga anclada a

las membranas, sino que otras modificaciones o la presencia de dominios de interacción determinan la localización correcta de la proteína.

El dominio de miristoilación en el extremo N-terminal, es necesario pero no suficiente para dirigir SH3TC2 a su destino celular (**Fig. 23**). Por ello, es necesaria también la presencia de los dominios SH3 o TPR, los cuales de forma independiente, son capaces de dirigir la proteína a su localización correcta (**Anexo IV-1 y IV-2**). Por lo tanto, pensamos que ambos dominios podrían estar mediando las interacciones de SH3TC2 con una misma proteína, o más bien con proteínas diferentes, que probablemente participan en el mismo complejo multiproteico.

Las mutaciones p.R529Q, p.E657K y p.R658C alteran la localización de la proteína en la membrana plasmática y en orgánulos de la ruta endocítica.

El transporte de los componentes de la mielina a su correcto destino celular es indispensable para la generación de una correcta envoltura de mielina en los axones. Mutaciones en una proteína pueden impedir la interacción con otras proteínas en su lugar de destino, o bien conllevar a un plegamiento aberrante con consecuencias dramáticas respecto a su localización y función. Por ello, se decidió analizar el efecto de algunas mutaciones patológicas de *SH3TC2* sobre la localización de la proteína.

Las mutaciones p.R529Q y p.A758D tienen un interés clínico específico: p.R529Q es una mutación con cambio de sentido, que en nuestra serie se ha detectado en homocigosis, en un paciente con fenotipo intermedio, y p.A758D es la única mutación identificada en una paciente con CMT. También se analizaron otras dos mutaciones no descritas en nuestra serie (p.E657K y p.R658C), por su proximidad, junto a p.R529Q y p.A758D, al primer dominio TPR, y otras dos mutaciones con pérdida de sentido, p.C737_P738delinsX y p.R1109X, descritas en población gitana. Por último, se incluyó en este análisis el cambio

p.R954X, una mutación con pérdida de sentido, fundadora en la población Franco-Canadiense. Esta última ha sido detectada también en un probando de nuestra serie (Lupo et al., 2009).

Ninguna de las tres mutaciones que codifican para proteínas truncadas (p.C737_P738delinsX, p.R954X y p.R1109X) mostraron alteraciones en la localización comparado con la proteína *wild-type*. Estos resultados no fueron sorprendentes, considerando que la construcción de la proteína mutada carente de todos los dominios TPR (Δ TRP), se localizaba correctamente. La explicación más probable es que los últimos dominios TPR ausentes en estas mutaciones, aunque no sean indispensables para la localización de la proteína, son importantes para su funcionalidad. Considerando que las mutaciones se testaron mediante mutagénesis dirigida del cDNA de SH3TC2, sería también posible que los transcritos mutados en su estado nativo se degraden directamente por ser reconocidas como mRNA sin sentido por parte de la célula. De esta forma sería irrelevante pensar en un defecto en la localización de la proteína, ya que se trataría de una ausencia total de la proteína.

En cambio, las tres mutaciones con cambio de aminoácido, p.R529Q, p.E657K y p.R658C, que se encuentran agrupadas en el primer dominio TPR, alteran la localización de la proteína (**Fig. 25; Anexo V-1 y V-2**). Este efecto, aunque variable, pero muy extremo en la mayoría de las células, implica una fuerte reducción de la localización a nivel de la membrana plasmática y una completa ausencia de la proteína en las vesículas endocíticas que colocalizan con SH3TC2 *wild-type*. Posteriormente, otros autores confirmaron que las mutaciones p.R529Q, p.E657K y p.R658C alteran la localización de la proteína, y demostraron también que estas mutaciones inhiben la interacción entre SH3TC2 y Rab11, provocando una alteración en el proceso endocítico de reciclaje (Roberts et al., 2010, Stendel et al., 2010). La mutación p.R529Q es la que más drásticamente afecta el patrón de expresión de SH3TC2, y curiosamente, en nuestra serie, ha sido encontrada en un caso

esporádico, diagnosticado de CMT. La p.R529Q había sido anteriormente descrita en dos pacientes de origen turco con CMT desmielinizante (Senderek et al., 2003a).

Estas observaciones nos sugieren dos conclusiones interesantes: (i) la región del primer dominio TPR es esencial para la localización de la proteína; y (ii) la pérdida de localización de SH3TC2, en el caso de las mutaciones *missense*, podría ser la causa patológica de la enfermedad. La primera de estas conclusiones se ve reforzada si consideramos que la construcción que codifica sólo para el dominio N-terminal junto con el primer dominio TPR (myr-TPR1), puede localizarse correctamente (**Fig. 27**). Queda por esclarecer si esta pérdida de localización es en sí misma la causa de la enfermedad, o bien las mutaciones por sí solas conducen a la pérdida total o parcial de la función de SH3TC2.

En comparación con las otras mutaciones con cambio de sentido, no encontramos ninguna alteración del patrón de expresión con la p.A758D. Este cambio había sido identificado en heterocigosis en un caso esporádico con fenotipo de CMT desmielinizante (Martinez-Rubio et al., 2008). No se ha identificado una segunda mutación en *SH3TC2*, y la búsqueda de mutaciones en otros genes (*PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, *GDAP1*, *SIMPLE* and *EGR2*) resultó también negativa. La búsqueda del cambio p.A758D en 101 individuos sanos resultó también negativo, sugiriendo pues que esta mutación podría ser patológica. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados, probablemente se trate de un polimorfismo, y mutaciones en otro gen implicado en CMT podría ser las responsables de la enfermedad en este caso.

SH3TC2, una proteína relacionada con el tráfico de membranas

El tráfico de las proteínas endosomales es un proceso muy dinámico y complejo, en el cual las proteínas son transportadas, recicladas y degradadas, en función de su destino. Este proceso puede ser regulado o ser constitutivo. Los compartimentos endosomales se

subdividen en varios componentes: (i) los endosomas tempranos, que pueden entrar en un proceso de *sorting* (SE, *sorting endosome*), o bien ser reciclados; (ii) los endosomas tardíos; (iii) los lisosomas. Los SE pueden tener tres destinos distintos: la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi y los lisosomas. Además, pueden estar implicados en el tráfico bi-direccional entre los endosomas y el *trans*-Golgi (Seaman, 2008, Ghosh, 1998, Hunt, 2005).

Los procesos de endocitosis, y también el transporte proteico desde el *trans*-Golgi hasta el compartimento endocítico, tienen una relación clara con la enfermedad de CMT, debido a que varias formas de CMT son causadas por proteínas que están implicadas con estos procesos celulares {Niemann, 2006 #1254}. Estas proteínas incluyen reguladores del tráfico de membrana como son las fosfatasas MTMR2 y MTMR13 (Wishart and Dixon, 2002), la GTPasa Dinamina 2 (Zuchner et al., 2005) y Rab7 (Vonderheit and Helenius, 2005), y la ubiquitina ligasa LITAF (Saifi et al., 2005). Otras proteínas implicadas en CMT se encuentran dentro de las moléculas cargo que necesitan ser transportadas desde el sistema endocítico y de *sorting*, y son principalmente componentes de la mielina: MPZ y PMP22. En la forma más prevalente de CMT, CMT1A, causada por la duplicación de *PMP22*, se ha observado que en la patología influyen las alteraciones en el tráfico intracelular y la degradación de proteínas de membrana causada por una sobredosis de la proteína PMP22 (Ryan et al., 2002). Nuestros hallazgos indican que SH3TC2 está relacionada con uno de los principales mecanismos patológicos implicados en CMT, la alteración del tráfico de membranas. Aunque nuestros resultados no nos permiten determinar si la proteína participa en esta maquinaria o si su función depende de ésta para alcanzar su destino o desempeñar su papel, podemos concluir que la pérdida de su localización subcelular podría ser la causa patológica de mutaciones *missense* en *SH3TC2*.

CAPÍTULO II

“Un defecto en la ruta de señalización Nrg1/ErbB, podría ser la causa del fenotipo hipomielinizante temprano en los ratones *Sh3tc2*^{-/-}”

Tras establecer una colaboración con el grupo del Dr. Roman Chrast, en el departamento de Genética Médica de la Université de Lausanne, nuestros estudios se centraron en el estudio de la fisiopatología de CMT4C, empleando como organismo modelo ratones *Sh3tc2^{-/-}*.

Las células de Schwann de los nervios periféricos se generan desde la cresta neural. Estas células dan lugar a una población de SCP (*Schwann Cell Precursor*), que en los ratones están presentes en estado embrionario E12-13. Posteriormente, las SCP dan lugar a una nueva población de células de Schwann inmaduras (E15-17). En la fase temprana postnatal, se decide cuáles de estas células deben envolver al axón, y este proceso ocurre mediante la transición de la célula de Schwann de una fase promielinizante a mielinizante, tardando esta última varias semanas en completarse. (Webster, 1971, Arroyo et al., 1998, Mirsky et al., 2002, Jessen and Mirsky, 2005). Sin embargo, las células de Schwann inmaduras pueden elegir otro destino y no mielinizar el axón, dando lugar a un agrupamiento de axones envueltos de una célula de Schwann no mielinizante.

SH3TC2 se expresa en la fase temprana de desarrollo de la mielina

El proceso de mielinización es muy complejo, y el destino de un axón, y sobre todo la correcta formación de la vaina de mielina, depende de múltiples factores que se expresan de forma diferente en función de la fase de desarrollo de la mielina (Jessen and Mirsky, 2005). La decisión entre la mielinización o la no mielinización, depende principalmente del metabolismo y expresión génica de la célula de Schwann. Por lo tanto, entender cuál es el perfil de expresión temporal de *Sh3tc2* en los ratones nos informaría sobre la fase de la mielinización en la que su proteína podría estar involucrada.

El análisis de los niveles de expresión de *Sh3tc2* mediante PCR cuantitativa a tiempo real, a partir de RNA procedente de nervio ciático

de ratón, muestran que *Sh3tc2* se expresa ya en fase embrionaria, y que su expresión se mantiene durante la fase de desarrollo de la mielina. Se detecta también expresión durante el estado adulto del ratón (P56), cuando la célula de Schwann comienza a ejercer un papel de mantenimiento de la mielina.

Las proteínas de regulación y síntesis de la mielina, suelen mostrar un pico de expresión destacable en el momento de la mielinización del axón, el que disminuye hasta un estado basal durante la fase de mantenimiento de la mielina (Verheijen et al., 2003). Si comparamos la expresión temporal de *Sh3tc2* con la de otras proteínas que presentan estos cambios durante la mielinización, llegamos a la conclusión de que la variación de expresión observada para *Sh3tc2* no es relevante. Aunque los resultados obtenidos no sugieren ninguna posible asociación entre la expresión de *Sh3tc2* y un estadio postnatal concreto, sí que es destacable el hecho de que *Sh3tc2* se exprese ya en una edad postnatal muy temprana.

El ratón *Sh3tc2*^{-/-} presenta un fenotipo hipomielinizante con aparición muy temprana

En el trabajo de Arnaud *et al.* (2009), en base a los estudios electrofisiológicos, al análisis morfométrico, y al análisis del transcriptoma, los autores concluyen que la deficiencia de mielinización en los ratones *Sh3tc2*^{-/-}, está ya presente a una edad de 28 días (P28) (Arnaud et al., 2009). En nuestro trabajo, hemos demostrado que en los ratones deficientes de *Sh3tc2*, las capas de mielina están reducidas ya a partir de una edad postnatal de 5 días (P5). En esta etapa las células de Schwann se encuentran en fase mielinizante, y cualquier perturbación podría alterar su fisiología, conllevando a una formación anómala o insuficiente de mielina. En el caso de un ratón WT, a P5 el axón está ya en contacto con la célula de Schwann, aunque aún no se ha establecido una correcta proporcionalidad entre el número de capas de mielina y el diámetro axonal. Pese a ello, el KO de *Sh3tc2* se diferencia del WT por

tener un menor número de capas de mielina alrededor del axón. A partir de diez días postnatales (P10), empieza a apreciarse la proporcionalidad axón/mielina en los ratones WT, mientras que ésta no se ha establecido aún en los KO de *Sh3tc2*, que presentan un menor número de capas de mielina. En conclusión, los resultados obtenidos indican que la hipomielinización existe a una edad muy temprana, que en términos fisiológicos corresponde a una fase muy activa de mielinización.

A parte del fenotipo hipomielinizante, los ratones *Sh3tc2*^{-/-} presentan también anomalías en la formación de los nodos de Ranvier, ya que resultan más largos que en el WT (Arnaud et al., 2009), mientras que sólo en casos raros se detectan las características histopatológicas descritas en los pacientes afectados de CMT4C (presencia de prolongaciones anómalas de lámina basal, formaciones tipo bulbos de cebolla, y anomalías en las células de Schwann no mielinizantes) (Houlden et al., 2009). Una explicación podría ser, que la hipomielinización probablemente exista a una edad muy temprana y el mecanismo patológico de esta neuropatía sea un proceso dismielinizante, ya que el proceso de formación de la mielina está alterado desde los primeros días de vida.

La ruta de señalización Nrg1/ErbB está alterada en el ratón *Sh3tc2*^{-/-}

Es llamativo el hecho de que los ratones *Sh3tc2*^{-/-} presentan alteraciones en los factores de transcripción implicados en la iniciación y progresión de la mielinización (*Scip* y *Krox20*), y también en los genes que codifican para proteínas relacionadas con la mielina (*Mbp*, *Mpz*, *Prx*, *Pmp22* y *Cx32*, entre otras) (Arnaud et al., 2009). Teniendo en cuenta que la correcta expresión de estas proteínas es crucial para una eficiente formación de la vaina de mielina, e indispensable en la fase de transición de la célula de Schwann promielinizante-mielinizante, nos planteamos la hipótesis de que *Sh3tc2* podría estar jugando un papel relevante en la regulación del transporte de estas moléculas, o bien en los procesos de

señalización intracelular de la célula de Schwann que regulan la expresión de las mismas.

Nuestros resultados y los de otros grupos (Lupo et al., 2009, Arnaud et al., 2009, Roberts et al., 2010, Stendel et al., 2010), sugieren una posible implicación de SH3TC2 en el tráfico de receptores de membrana que probablemente participan en los procesos de señalización que regulan la mielinización. Sin duda, entre estos procesos, la ruta de señalización Nrg1/ErbB desempeña un papel fundamental. En roedores, mutaciones en los receptores *ErbB2* y *ErbB3*, junto con *Nrg1*, causan severas deficiencias en las neuronas periféricas y células de Schwann. Estos ratones presentan un fenotipo hipomielinizante de los nervios periféricos muy similar entre ellos, debido a la fuerte asociación de estas tres proteínas con los procesos de mielinización del axón (Nave and Salzer, 2006). (Riethmacher et al., 1997, Garratt et al., 2000, Michailov et al., 2004, Taveggia et al., 2005). La comparación entre el fenotipo de estos modelos animales con el del KO de *Sh3tc2*, mostró grandes semejanzas tanto en la edad de aparición de la hipomielinización como en sus características histopatológicas. En la **figura 35** se muestra la comparación entre el fenotipo hipomielinizante del ratón *Sh3tc2*^{-/-} y el KO condicional de *ErbB2*, que es deficiente de este receptor exclusivamente en las células de Schwann. En particular, en el caso de este modelo murino, el fenotipo era debido a un menor número de capas de mielina alrededor del axón, y su aparición era muy temprana (Garratt et al., 2000). Además, se ha descrito que los ratones KO de *Erbin*, una proteína reguladora de la estabilidad e internalización del receptor ErbB2, presenta un fenotipo hipomielinizante en estadio temprano (Tao et al., 2009). La fuerte similitud en el fenotipo hipomielinizante entre ratones KO de genes implicados en la misma ruta de señalización Nrg1/ErbB, y el ratón *Sh3tc2*^{-/-}, sugirió que sería de interés estudiar cuál podría ser el efecto de una deficiencia de *Sh3tc2* en esta ruta de señalización. Además los resultados previos obtenidos sobre la biología celular de SH3TC2

(Lupo et al., 2009), apoyan la hipótesis de una posible implicación de SH3TC2 como proteína adaptadora en esta ruta.

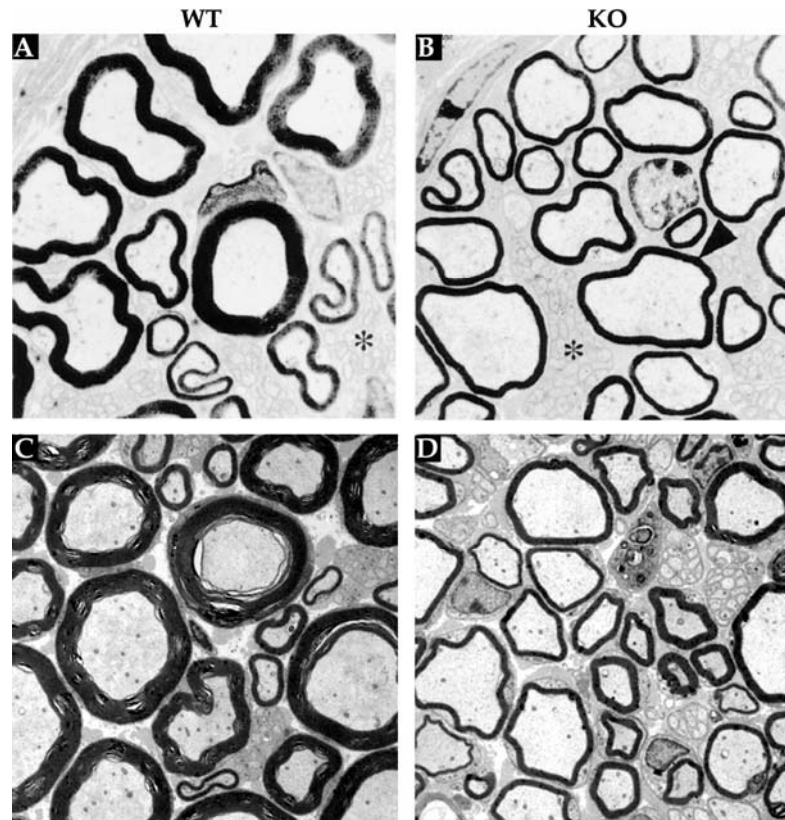


Fig. 35: Comparación de fenotipos entre el modelo murino mutante de *ErbB2* (A: WT; B: KO condicional de *ErbB2*) y el de *Sh3tc2* (C: WT; D: KO de *Sh3tc2*). (A-B) Adaptado de Garratt *et al.* (Garratt et al., 2000). (C-D) Adaptado de Arnaud *et al.* (Arnaud et al., 2009).

El factor de crecimiento *Nrg1*, y específicamente la isoforma asociada a membranas de tipo III, es un componente clave para el proceso de formación y mantenimiento de la mielina (Lemke, 2006). *Nrg1* se expresa en la superficie del axón y se une a los receptores tirosina quinasa ErbB en las células de Schwann, proceso necesario para iniciar la mielinización (Lemke, 2006). Los mayores representantes de los receptores ErbB en las células de Schwann son ErbB2 y ErbB3, que necesitan heterodimerizar para poder ser funcionales (Adlkofer and Lai,

2000). Los receptores ErbB activan varias cascadas de señalización, y su activación desencadena una compleja secuencia de interacciones entre moléculas, que resulta en un reclutamiento de proteínas adaptadoras y enzimas, hacia el residuo fosfotirosina de los receptores (**Fig. 7**) (Newbern and Birchmeier, 2010). Los últimos efectores de esta ruta son los factores de transcripción, que regulan la expresión de los genes implicados en el desarrollo de la mielina. Entre éstos, los factores de transcripción Scip (Oct6/Tst-1) y Krox20 (Egr2), representan dos moléculas fundamentales en el proceso de diferenciación de la célula de Schwann (Topilko et al., 1994, Zorick et al., 1996b, Zorick et al., 1999).

El análisis de la ruta de señalización Nrg1/ErbB mediante *Western blot*, empleando extractos proteicos de *endoneurium* de nervio ciático, indica que los niveles totales de Nrg1 se mantienen normales en los ratones *Sh3tc2^{-/-}*, sugiriendo que la señal del axón a la célula de Schwann no está afectada. En cambio, el grado de fosforilación de ambos receptores, p-ErbB2 y p-ErbB3, está aumentado en los ratones *Sh3tc2^{-/-}* respecto al WT, en los primeros días de vida (P2 y P5) (**Fig. 30A-B**). Estos resultados, confirman nuevamente que la fisiología del nervio periférico está afectada en una edad muy temprana, que corresponde a una fase crucial para la célula de Schwann y el axón. La alteración de cualquier componente de la ruta Nrg1/ErbB podría ser suficiente para provocar un fallo en las cascadas de señalización que regulan la mielinización, conduciendo así a una formación anómala de la mielina.

Con el fin de investigar la posible relación entre la hipomielinización observada en los ratones *Sh3tc2^{-/-}* y el aumento de p-ErbB2 y p-ErbB3, analizamos el nivel de expresión del factor de transcripción Krox20 (Egr2). El factor de transcripción Krox20 es de particular interés debido a que coordina la expresión de varias proteínas estructurales, siendo fundamental en la fase de transición promielinizante-mielinizante. Además representa uno de los últimos efectores de la ruta de señalización Nrg1/ErbB (Kao et al., 2009), así que

una alteración de la misma podría traducirse en un cambio en la expresión de Krox20.

Nuestro análisis mediante *Western blot*, confirmó que el producto génico de *Krox20* está fuertemente disminuido a la edad de 10 días postnatales (P10), un estadio crítico para la fisiología de la célula de Schwann. Este hallazgo, explica el fenotipo hipomielinizante, y además sugiere que los receptores ErbB deben estar en un estado hiperfosforilado pero incapaz de activar correctamente las cascadas de señalización que regulan la expresión de Krox20.

En su conjunto, estos resultados sugieren que SH3TC2 podría participar en la regulación de la ruta Nrg1/ErbB en una fase de mielinización postnatal temprana, de modo que una deficiencia de SH3TC2 en la célula de Schwann podría conducir a defectos de señalización y posterior aparición temprana de la neuropatía observada en los pacientes de CMT4C. La incapacidad por parte de la célula de Schwann de mielinizar correctamente explicaría no sólo la disminución del número de capas de mielina, sino también el fenotipo anómalo de los nodos de Ranvier encontrado tanto en los ratones *Sh3tc2*^{-/-} como en los pacientes de CMT4C (Arnaud et al., 2009). Este último aspecto podría ser debido a un defecto en la elongación por parte de la célula de Schwann, conjuntamente con su incapacidad de envolver el axón.

SH3TC2 podría estar jugando un papel en el proceso de internalización de los receptores ErbB

Aunque se conocen muchas moléculas implicadas en los procesos de mielinización, poco se sabe sobre los procesos bioquímicos que la regulan. SH3TC2 podría ser otra proteína clave para la mielinización, involucrada probablemente en la internalización de los receptores ErbB. Los estudios de localización subcelular muestran que ErbB2 y SH3TC2 presentan un patrón similar, tanto vesicular como de membrana

plasmática, y que ambas proteínas colocalizan mayoritariamente en la membrana plasmática (**Fig. 31A**).

Se ha demostrado que el tratamiento de células con PAO inhibe la internalización de los receptores ErbB desde la membrana celular (Bild et al., 2002, Yang et al., 2005). Sorprendentemente, tras tratamiento con PAO, tanto SH3TC2 como ErbB2 se concentran y colocalizan exclusivamente en la membrana celular (**Fig. 31B**). La internalización de ErbB2 puede ocurrir por un mecanismo dependiente de clatrina, dependientes de caveolas, o independientes de éstas (Barr et al., 2008). Su internalización depende también del tipo celular, y una actividad tirosina quinasa y la eficiencia de muchos otros factores es necesaria para la correcta internalización. Probablemente PAO esté inhibiendo un proceso de internalización en el que SH3TC2 juega un papel regulador.

Con el objetivo de verificar la posible participación de SH3TC2 en el proceso de internalización de los receptores ErbB, realizamos dos experimentos: (1) estudio de asociación entre SH3TC2 y la internalización *in vivo* de ErbB2, mediante la técnica de *Antibody feeding*; y (2) estudio del efecto de una sobreexpresión de SH3TC2 sobre la internalización de ErbB2, mediante ensayos de biotilación. El primer experimento indica que, a $t=0$, cuando el proceso de internalización está bloqueado, ErbB2 se encuentra exclusivamente localizado en la membrana plasmática, mientras que a los 5 min de inducción con Nrg1 a 37°C, ya parte de ErbB2 se encuentra mayoritariamente en vesículas de endocitosis submembranales. Durante este proceso inicial de internalización, que correspondería al reclutamiento de proteínas adaptadoras y a la formación de vesículas de endocitosis *de novo*, SH3TC2 y ErbB2 muestran la misma localización en la célula, lo que subraya la asociación entre ambas proteínas (**Fig. 33**). Probablemente, SH3TC2 está siendo reclutada junto a otras proteínas para participar en el proceso de internalización de ErbB2. A los 15-30 min de internalización SH3TC2 y ErbB2 se encuentran localizadas parcialmente en las mismas

vesículas citoplasmáticas, y en algunos casos se localizan agregadas en las mismas estructuras. Estos agregados proteicos podrían ser la causa de un proceso de internalización masivo y/o a cuerpos multivesiculares, a partir de los cuales las proteínas se degradarían o serían recicladas hacia la membrana plasmática. En definitiva, estos resultados fortalecen la hipótesis de una posible asociación entre SH3TC2 y ErbB2 durante el proceso de internalización.

Finalmente, en el segundo experimento, corroboramos que, en células HeLa, la sobreexpresión de SH3TC2 aumenta la internalización de ErbB2, ya que se detectó una mayor cantidad de este receptor en el compartimiento intracelular tras inducir la endocitosis (**Fig. 34**).

Todos estos hallazgos, indican que SH3TC2 interacciona con la ruta Nrg1/ErbB, interviniendo probablemente durante el proceso de internalización. Así pues, para definir el mecanismo bioquímico según el cual una deficiencia de Sh3tc2 podría afectar la producción de mielina, y consecuentemente provocar la neuropatía, planteamos la hipótesis de un modelo celular que explica la posible función de Sh3tc2 en la célula de Schwann. En el modelo propuesto (**Fig. 36**), SH3TC2 estaría anclado en la cara intracelular de la membrana plasmática de la célula de Schwann, mediante el dominio de miristoilación y probablemente por otras interacciones mediadas por los dominios SH3 y/o TPR (Lupo et al., 2009). SH3TC2 se localizaría también en la ruta endocítica (Lupo et al., 2009) , y en particular, en el compartimiento endocítico de reciclaje, como ha sido recientemente descrito (Stendel et al., 2010).

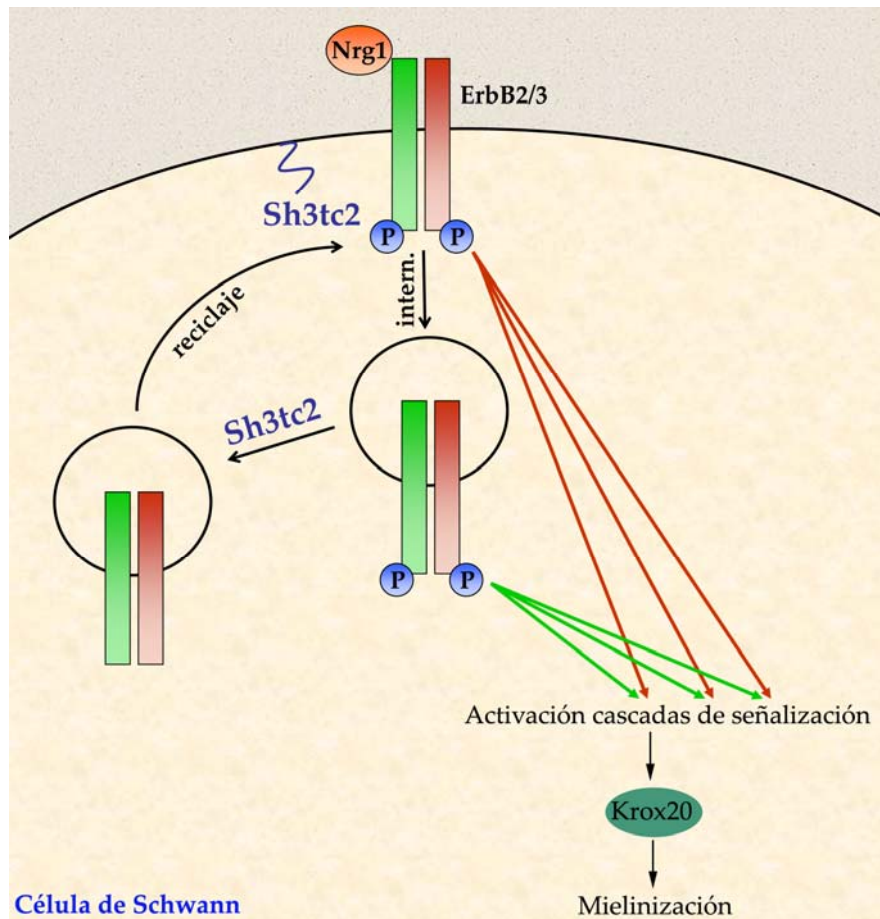


Fig. 36. Modelo propuesto que ilustra la posible implicación de Sh3tc2 en el proceso de señalización de la ruta Nrg1/ErbB.

Como hemos descrito previamente, cuando el axón entra en contacto con la célula de Schwann, éste genera una señal mediada por Nrg1, que estimula la heterodimerización y fosforilación de los receptores ErbB2 y ErbB3 (p-ErbB2 y p-ErbB3). Posteriormente, el reclutamiento de moléculas adaptadoras ayuda a la internalización de los receptores que así activan las cascadas de señalización, que puede ocurrir desde la membrana plasmática como también desde los endosomas tempranos. Estudios *in vitro*, demuestran que al expresar el mutante dominante-negativo de dinamina p.K44A se aprecian sólo pequeños

cambios en la fosforilación de los receptores ErbB (Yang et al., 2005), sugiriendo que su fosforilación ocurre antes que la internalización.

Considerando que una deficiencia de Sh3tc2 se traduce en un aumento de p-ErbB2 y p-ErbB3, probablemente SH3TC2 estaría involucrado en un proceso posterior a la fosforilación. Los receptores pueden ser reciclados para potenciar la señalización, y/o bien degradados para regular su umbral de expresión intracelular. En nuestro modelo (**Fig. 36**), una deficiencia de SH3TC2 provocaría un bloqueo de la internalización de los receptores ErbB, lo que conduciría a un aumento de su estado fosforilado y activo en la membrana plasmática, pero incapaz de activar las cascadas de señalización, incluida las que ocurren en los endosomas tempranos.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de SH3TC2 en HeLa disminuye el número de receptores de la transferrina (*Tfr*, *Transferrin receptor*) en la superficie celular, sugiriendo que la sobreexpresión de SH3TC2 estaría bloqueando el reciclaje del receptor hacia la membrana plasmática. Así, se postula que SH3TC2 podría jugar un papel importante en el transporte y reciclaje de receptores implicados en la mielinización, (Roberts et al., 2010, Stendel et al., 2010). Estos últimos resultados no descartan la posibilidad de que la deficiencia de SH3TC2 podría también afectar al reciclaje de los receptores ErbB, de forma independiente o conjuntamente al bloqueo de la internalización.

En conclusión, tanto un bloqueo de la internalización como probablemente un fallo en el reciclaje, sería responsable de un desequilibrio en la activación de las cascadas de señalización intracelulares mediadas por los receptores ErbB, que conduciría a una disminución en la expresión de factores de transcripción, tal y como sucede con Krox20. Consecuentemente, una menor síntesis de proteínas estructurales de la mielina sería la causa directa de una deficiencia funcional de SH3TC2 y el detonante para el desarrollo de la neuropatía. SH3TC2 podría considerarse un nuevo jugador que participaría en el

complejo mecanismo que subyace en la comunicación axón-célula de Schwann. Si bien son necesarios más estudios para determinar con total precisión la participación de SH3TC2 en la ruta Nrg1/ErbB, podemos concluir que su presencia en la célula de Schwann es imprescindible para que la maquinaria de señalización que regula la mielinización funcione correctamente.

CONCLUSIONES

1. *SH3TC2* se expresa fundamentalmente en líneas establecidas procedentes de células de Schwann humanas y murinas, lo que confirma resultados de otros autores en los que se ha demostrado la expresión preferencial en células de Schwann de ratón.
2. La proteína *SH3TC2* se localiza en membrana plasmática y en componentes de la ruta endocítica. Hemos demostrado que se localiza en endosomas tempranos, endosomas tardíos y vesículas recubiertas de clatrina.
3. La N-miristoilación en la glicina 2 es necesaria para la correcta localización de *SH3TC2* en las membranas celulares, esto es, la membrana plasmática y las membranas de las vesículas del sistema de endocitosis.
4. La asociación de *SH3TC2* a las membranas celulares no sólo requiere de una correcta N-miristoilación sino también de la presencia de los dominios SH3 y/o TPR.
5. Las mutaciones patológicas p.R529Q, p.E657K y p.R658C alteran la correcta localización de *SH3TC2* en la membrana plasmática y en los componentes de la ruta endocítica, sugiriendo que la pérdida de su localización podría ser la causa patológica que subyace en los pacientes de CMT4C portadores de estas mutaciones.
6. Los ratones *Sh3tc2*^{-/-} muestran un fenotipo hipomielinizante precoz que se observa ya a la edad postnatal P5. Esto es acorde con el hecho de que la proteína murina *Sh3tc2* se expresa en el nervio ciático en los primeros días de la vida.
7. En extractos proteicos de nervio ciático de ratones *Sh3tc2*^{-/-} la fosforilación de los receptores ErbB2 y ErbB3 está incrementada a P5 y P2 respectivamente, de forma estadísticamente significativa. Al mismo tiempo el factor de transcripción mielinizante Krox20 está drásticamente disminuido. Tomados en su conjunto, ambos hallazgos sugieren que hay una alteración de la ruta de

Conclusiones

señalización Nrg1/ErbB que no permitiría la regulación positiva de los genes estructurales de la mielina.

8. SH3TC2 representa una nueva proteína adaptadora de la ruta Nrg1/ErbB, favoreciendo a la internalización del receptor ErbB2. Una deficiencia de SH3TC2 interrumpiría la señal del axón a la célula de Schwann para que se inicie la mielinización, lo que explicaría la hipomielinización observada en los pacientes con la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Adams R., Murice V., Allan HR. (1999). Enfermedades de los nervios periféricos. *Principios de Neurología*: 1159-1162.
- Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1997) Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 17:4662-4671.
- Adlkofer K, Lai C (2000) Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* 29:104-111.
- Arancibia-Carcamo IL, Fairfax BP, Moss SJ, Kittler JT (2006) Studying the Localization, Surface Stability and Endocytosis of Neurotransmitter Receptors by Antibody Labeling and Biotinylation Approaches.
- Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles AS, Stendel C, Roos A, Medard JJ, Tricaud N, Weis J, Suter U, Senderek J, Chrast R (2009) SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17528-17533.
- Arroyo EJ, Bermingham JR, Jr., Rosenfeld MG, Scherer SS (1998) Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci* 18:7891-7902.
- Azzedine H, Bolino A, Taieb T, Birouk N, Di Duca M, Bouhouche A, Benamou S, Mrabet A, Hammadouche T, Chkili T, Gouider R, Ravazzolo R, Brice A, Laporte J, LeGuern E (2003) Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am J Hum Genet* 72:1141-1153.

Azzedine H, Ravise N, Verny C, Gabreels-Festen A, Lammens M, Grid D, Vallat JM, Durosier G, Senderek J, Nouioua S, Hamadouche T, Bouhouche A, Guilbot A, Stendel C, Ruberg M, Brice A, Birouk N, Dubourg O, Tazir M, LeGuern E (2006) Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology* 67:602-606.

B

Barisic N, Claeys KG, Sirotkovic-Skerlev M, Lofgren A, Nelis E, De Jonghe P, Timmerman V (2008) Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation. *Ann Hum Genet* 72:416-441.

Barr DJ, Ostermeyer-Fay AG, Matundan RA, Brown DA (2008) Clathrin-independent endocytosis of ErbB2 in geldanamycin-treated human breast cancer cells. *J Cell Sci* 121:3155-3166.

Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30:21-22.

Bennett CL, Shirk AJ, Huynh HM, Street VA, Nelis E, Van Maldergem L, De Jonghe P, Jordanova A, Guergueltcheva V, Tournev I, Van Den Bergh P, Seeman P, Mazanec R, Prochazka T, Kremensky I, Haberlova J, Weiss MD, Timmerman V, Bird TD, Chance PF (2004) SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol* 55:713-720.

Berciano J., Gallardo E., Garcia A., Pelayo-Negro A.L., Infante J. Y Combarros O. (2011). Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: revisión con énfasis en la fisiopatología del pie cavo. *Rev esp ci ortop traumato*

Berger P, Berger I, Schaffitzel C, Tersar K, Volkmer B, Suter U (2006) Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2. *Hum Mol Genet* 15:569-579.

- Berger P, Bonneick S, Willi S, Wymann M, Suter U (2002) Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum Mol Genet* 11:1569-1579.
- Bermingham JR, Jr., Scherer SS, O'Connell S, Arroyo E, Kalla KA, Powell FL, Rosenfeld MG (1996) Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev* 10:1751-1762.
- Bild AH, Turkson J, Jove R (2002) Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *EMBO J* 21:3255-3263.
- Birchmeier C (2009) ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res* 315:611-618.
- Blatch GL, Lassel M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939.
- Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR (2002) Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 51:190-201.
- Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, Garcia CA, Leber SM, Rhee-Morris L, Lupski JR (2001) Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet* 68:325-333.
- Bolino A, Bolis A, Previtali SC, Dina G, Bussini S, Dati G, Amadio S, Del Carro U, Mruk DD, Feltri ML, Cheng CY, Quattrini A, Wrabetz L (2004) Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin unfolding and impaired spermatogenesis. *J Cell Biol* 167:711-721.

Bibliografía

- Bolino A, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Schenone A, Gambardella A, Bono F, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP (2000) Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* 25:17-19.
- Bonneick S, Boentert M, Berger P, Atanasoski S, Mantei N, Wessig C, Toyka KV, Young P, Suter U (2005) An animal model for Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum Mol Genet* 14:3685-3695.
- Buday L (1999) Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422:187-204.
- Burns J, Ouvrier RA, Yiu EM, Joseph PD, Kornberg AJ, Fahey MC, Ryan MM (2009) Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol* 8:537-544.

C

- Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Danehy FT, Jr., Nolan C, Scherer SS, Lucas J, Gwynne D, Marchionni MA (1994) Expression of multiple neuregulin transcripts in postnatal rat brains. *J Comp Neurol* 349:389-400.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284:54-65.
- Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, Cuesta A, Millan JM, Vilchez J, Palau F, Espinos C (2007) The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clinical Genetics* 71:343-349.
- Cohen JA, Yachnis AT, Arai M, Davis JG, Scherer SS (1992) Expression of the neu proto-oncogene by Schwann cells during peripheral nerve development and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 31:622-634.

- Colomer J, Gooding R, Angelicheva D, King RH, Guillen-Navarro E, Parman Y, Nascimento A, Conill J, Kalaydjieva L (2006) Clinical spectrum of CMT4C disease in patients homozygous for the p.Arg1109X mutation in SH3TC2. *Neuromuscul Disord* 16:449-453.
- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J (1987) Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 75:9-12.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.
- Coppi MV, Guidotti G (1997) Intracellular localization of Na,K-ATPase alpha2 subunit mutants. *Arch Biochem Biophys* 346:312-321.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marin I, Vilchez JJ, Palau F (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30:22-25.

D

- D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28:655-662.
- Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P (2006) Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci* 26:9771-9779.
- Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, Poitelon Y, Baudot C, Boccaccio I, Chouery E, Chaouch M, Kassouri N, Jabbour R, Grid D, Megarbane A, Haase G, Levy N (2007) Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet* 81:1-16.
- Dyck PJ, C. P., Lebo R, Carney JA, et al (1993). Hereditary motor and sensory neuropathies, in *Peripheral neuropathy*. 1094-1136.

Bibliografia

Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ (1994) Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J* 13:4269-4277.

E

Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA (2006) Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Rev* 51:161-175.

F

Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30.

Friede RL (1972) Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J Comp Neurol* 144:233-252.

G

Gabreels-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, LeGuern E, Gabreels F, van Engelen B, Mariman E (1999) Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:569-574.

Gabreels-Festen AA, Joosten EM, Gabreels FJ, Jennekens FG, Janssen-van Kempen TW (1992) Early morphological features in dominantly inherited demyelinating motor and sensory neuropathy (HMSN type I). *J Neurol Sci* 107:145-154.

Garcia CA (1999) A clinical review of Charcot-Marie-Tooth. *Ann N Y Acad Sci* 883:69-76.

Grant BD, Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:597-608.

Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P, Birchmeier C (2000) A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148:1035-1046.

- Ghosh RN, Mallet WG, Soe TT, McGraw TE, Maxfield FR (1998) An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol* 142:923-936.
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-576.
- Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VC, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ (2000) Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26:523-531.
- Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, Chandler D, Bertranpetit J, Kalaydjieva L (2005) A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet* 42:e69.
- Gosselin I, Thiffault I, Tetreault M, Chau V, Dicaire MJ, Loisel L, Emond M, Senderek J, Mathieu J, Dupre N, Vanasse M, Puymirat J, Brais B (2008) Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster. *Neuromuscul Disord* 18:483-492.
- Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:721-730.
- Guyton GP, Mann RA (2000) The pathogenesis and surgical management of foot deformity in Charcot-Marie-Tooth disease. *Foot Ankle Clin* 5:317-326.

H

- Hantke J, Chandler D, King R, Wanders RJ, Angelicheva D, Tournev I, McNamara E, Kwa M, Guergueltcheva V, Kaneva R, Baas F, Kalaydjieva L (2009) A mutation in an alternative untranslated exon of hexokinase 1 associated with hereditary motor and sensory neuropathy -- Russe (HMSNR). *Eur J Hum Genet* 17:1606-1614.

Bibliografía

- Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-280.
- Hayashi N, Titani K (2010) N-myristoylated proteins, key components in intracellular signal transduction systems enabling rapid and flexible cell responses. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:494-508.
- Houlden H, Laura M, Ginsberg L, Jungbluth H, Robb SA, Blake J, Robinson S, King RH, Reilly MM (2009) The phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to SH3TC2 mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy. *Neuromuscul Disord* 19:264-269.
- Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, Ghosh S, Travis SP, Walters JR, Jewell DP, Playford RJ, van Heel DA (2005) A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet* 13:440-444.
- Hunter M, Bernard R, Freitas E, Boyer A, Morar B, Martins IJ, Tournev I, Jordanova A, Guergelcheva V, Ishpekova B, Kremensky I, Nicholson G, Schlotter B, Lochmuller H, Voit T, Colomer J, Thomas PK, Levy N, Kalaydjieva L (2003) Mutation screening of the N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum Mutat* 22:129-135.

J

- Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D (1996) The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science* 273:507-510.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.

K

- Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P, Rosenthal A, King RH, Thomas PK (2000) N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet* 67:47-58.
- Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F, Shmarov A, Petrova J, Turnev I, Hristova A, Moskov M, Stancheva S, Petkova I, Bittles AH, Georgieva V, Middleton L, Thomas PK (1996) Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet* 14:214-217.
- Kaneko T, Li L, Li SS (2008) The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* 13:4938-4952.
- Kao SC, Wu H, Xie J, Chang CP, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR (2009) Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* 323:651-654.
- Kim HA, DeClue JE, Ratner N (1997) cAMP-dependent protein kinase A is required for Schwann cell growth: interactions between the cAMP and neuregulin/tyrosine kinase pathways. *J Neurosci Res* 49:236-247.
- Kirkham M, Parton RG (2005) Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 1746:349-363.

L

- Lassuthova P, Mazanec R, Vondracek P, Siskova D, Haberlova J, Sabova J, Seeman P (2011) High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clin Genet*.

Bibliografía

- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J (2005) Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2596-2601.
- Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L, Svaren J (2005) Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 93:737-748.
- LeBlanc SE, Ward RM, Svaren J (2007) Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* 27:3521-3529.
- LeGuern E, Guilbot A, Kessali M, Ravise N, Tassin J, Maisonobe T, Grid D, Brice A (1996) Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33. *Hum Mol Genet* 5:1685-1688.
- Lemke G (2006) Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006:pe11.
- Lencer WI, Saslowsky D (2005) Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. *Biochim Biophys Acta* 1746:314-321.
- Li Y, Tennekoon GI, Birnbaum M, Marchionni MA, Rutkowski JL (2001) Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* 17:761-767.
- Lindeman E, Spaans F, Reulen J, Leffers P, Drukker J (1999) Progressive resistance training in neuromuscular patients. Effects on force and surface EMG. *J Electromyogr Kinesiol* 9:379-384.
- Ludes-Meyers JH, Kil H, Bednarek AK, Drake J, Bedford MT, Aldaz CM (2004) WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene* 23:5049-5055.

- Lupo V, Galindo MI, Martínez-Rubio D, Sevilla T, Vilchez JJ, Palau F, Espinos C (2009) Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet* 18:4603-4614.
- Lupski JR (1997) Charcot-Marie-Tooth disease: a gene-dosage effect. *Hosp Pract (Minneap)* 32:83-84, 89-91, 94-85 passim.
- Lupski JR (2000) Recessive Charcot-Marie-tooth disease. *Ann Neurol* 47:6-8.
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, McGuire AL, Zhang F, Stankiewicz P, Halperin JJ, Yang C, Gehman C, Guo D, Irikat RK, Tom W, Fantin NJ, Muzny DM, Gibbs RA (2010) Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362:1181-1191.
- Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI (1992) Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1:29-33.

M

- Mann DC, Hsu JD (1992) Triple arthrodesis in the treatment of fixed cavovarus deformity in adolescent patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Foot Ankle* 13:1-6.
- Martínez-Rubio D, Millán JM, Palau F, Espinos C (2008) Gene symbol: SH3TC2. Disease: Charcot-Marie-Tooth type 4C. *Hum Genet* 124:320.
- Martínez-Rubio D, Jaijo T, Sevilla T, Millán JM, Vilchez JJ, Palau F, Espinos C. 2010. Rationalisation of Molecular Diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. IV Reunión Científica Annual CIBERER – Madrid 2010.
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310.

Bibliografía

- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286.
- Maurel P, Salzer JL (2000) Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* 20:4635-4645.
- McPherson PS (1999) Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell Signal* 11:229-238.
- McPherson PS, Kay BK, Hussain NK (2001) Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* 2:375-384.
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE (2004) Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *J Neurosci* 24:3186-3198.
- Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 67:37-46.
- Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW (2007) Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol* 61:61-72.
- Micallef J, Attarian S, Dubourg O, Gonnaud PM, Hogrel JY, Stojkovic T, Bernard R, Jouve E, Pitel S, Vacherot F, Remec JF, Jomir L, Azabou E, Al-Moussawi M, Lefebvre MN, Attolini L, Yaici S, Tanesse D, Fontes M, Pouget J, Blin O (2009) Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 8:1103-1110.

- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Mikol DD, Scherer SS, Duckett SJ, Hong HL, Feldman EL (2002) Schwann cell caveolin-1 expression increases during myelination and decreases after axotomy. *Glia* 38:191-199.
- Montenegro G, Powell E, Huang J, Speziani F, Edwards YJ, Beecham G, Hulme W, Siskind C, Vance J, Shy M, Zuchner S (2011) Exome sequencing allows for rapid gene identification in a Charcot-Marie-Tooth family. *Ann Neurol* 69:464-470.
- Monuki ES, Kuhn R, Weinmaster G, Trapp BD, Lemke G (1990) Expression and activity of the POU transcription factor SCIP. *Science* 249:1300-1303.
- Moriwaki Y, Begum NA, Kobayashi M, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T (2001) Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem* 276:23065-23076.
- Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 96:17-24.

N

- Nagarajan R, Le N, Mahoney H, Araki T, Milbrandt J (2002) Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8998-9003.
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J (2001) EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30:355-368.

Bibliografia

- Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG (2003) Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 14:417-431.
- Nave KA, Salzer JL (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16:492-500.
- Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, Belpaire-Dethiou MC, Ceuterick C, Van Gerwen V, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Gabreels-Festen AA, Verellen C, Tan E, Demirci M, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Topaloglu H, Timmerman V (2002) Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 59:1865-1872.
- Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Lofgren A, Vandenberghe A, Latour P, Le Guern E, Brice A, Mostacciuolo ML, Schiavon F, Palau F, Bort S, Upadhyaya M, Rocchi M, Archidiacono N, Mandich P, Bellone E, Silander K, Savontaus ML, Navon R, Goldberg-Stern H, Estivill X, Volpini V, Friedl W, Gal A, et al. (1996) Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 4:25-33.
- Newbern J, Birchmeier C (2010) Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol*.
- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217-242.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*.
- Njegovan ME, Leonard EI, Joseph FB (1997) Rehabilitation medicine approach to Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Podiatr Med Surg* 14:99-116.

O

Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S (2004) Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neurosci* 24:6724-6732.

P

Pareyson D (2007) Axonal Charcot-Marie-Tooth disease: the fog is only slowly lifting. *Neurology* 68:1649-1650.

Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, Visioli F, Laura M, Radice D, Calabrese D, Hughes RA, Solari A (2011) Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 10:320-328.

Pareyson D, Scaiola V, Laura M (2006) Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:3-22.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M (2004) Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10:396-401.

Pawson T (2007) Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 19:112-116.

Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14:1087-1094.

R

- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA, et al. (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1:93-97.
- Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451:1-16.
- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730.
- Roberts RC, Peden AA, Buss F, Bright NA, Latouche M, Reilly MM, Kendrick-Jones J, Luzio JP (2010) Mistargeting of SH3TC2 away from the recycling endosome causes Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Hum Mol Genet* 19:1009-1018.
- Robinson FL, Niesman IR, Beiswenger KK, Dixon JE (2008) Loss of the inactive myotubularin-related phosphatase Mtmr13 leads to a Charcot-Marie-Tooth 4B2-like peripheral neuropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4916-4921.
- Rutherford AC, Traer C, Wassmer T, Pattni K, Bujny MV, Carlton JG, Stenmark H, Cullen PJ (2006) The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J Cell Sci* 119:3944-3957.
- Ryan MC, Shooter EM, Notterpek L (2002) Aggresome formation in neuropathy models based on peripheral myelin protein 22 mutations. *Neurobiol Dis* 10:109-118.

S

- Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, Shy ME, Krajewski K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A, Reeser S, Mancias P, Butler I, Lupski JR (2005) SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat* 25:372-383.
- Sandvig K, van Deurs B (2002) Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* 529:49-53.
- Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME (2011) Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 69:22-33.
- Scherer SS, Wrabetz L (2008) Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia* 56:1578-1589.
- Scherer SS, Xu YT, Messing A, Willecke K, Fischbeck KH, Jeng LJ (2005) Transgenic expression of human connexin32 in myelinating Schwann cells prevents demyelination in connexin32-null mice. *J Neurosci* 25:1550-1559.
- Seaman MN (2008) Endosome protein sorting: motifs and machinery. *Cell Mol Life Sci* 65:2842-2858.
- Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Muller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhmann M, Rudnik-Schoneborn S, Zuchner S, Michael Schroder J, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Buttner R, Nelis E, Zerres K (2003a) Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet* 73:1106-1119.

- Senderek J, Bergmann C, Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, Rudnik-Schoneborn S, Buttner R, Buchheim E, Zerres K (2003b) Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet* 12:349-356.
- Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, Uzma N, Nave KA (2003) Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9:1533-1537.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Shy ME, Jani A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, Shy RR, Balsamo J, Lilien J, Garbern JY, Kamholz J (2004) Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 127:371-384.
- Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6:98-118.
- Smith K, McDonald I, Millar D, Lassmann H. 2005. The pathophysiology of multiple sclerosis. In: Compston A, editor. *McAlpine's multiple sclerosis*. Oxford: Churchill Livingstone. Pp 601-660.
- Stendel C, Roos A, Deconinck T, Pereira J, Castagner F, Niemann A, Kirschner J, Korinthenberg R, Ketelsen UP, Battaloglu E, Parman Y, Nicholson G, Ouvrier R, Seeger J, De Jonghe P, Weis J, Kruttgen A, Rudnik-Schoneborn S, Bergmann C, Suter U, Zerres K, Timmerman V, Relvas JB, Senderek J (2007) Peripheral nerve demyelination caused by a mutant Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, frabin/FGD4. *Am J Hum Genet* 81:158-164.
- Stendel C, Roos A, Kleine H, Arnaud E, Ozcelik M, Sidiropoulos PN, Zenker J, Schupfer F, Lehmann U, Sobota RM, Litchfield DW, Luscher B, Chrast R, Suter U, Senderek J (2010) SH3TC2, a protein mutant in Charcot-Marie-Tooth neuropathy, links peripheral nerve myelination to endosomal recycling. *Brain* 133:2462-2474.

- Suter U (2007) Phosphoinositides and Charcot-Marie-tooth disease: new keys to old questions. *Cell Mol Life Sci* 64:3261-3265.
- Swiatek PJ, Gridley T (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev* 7:2071-2084.
- Szigeti K, Garcia CA, Lupski JR (2006) Charcot-Marie-Tooth disease and related hereditary polyneuropathies: molecular diagnostics determine aspects of medical management. *Genet Med* 8:86-92.
- Szigeti K, Lupski JR (2009) Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet* 17:703-710.

T

- Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, Ceuterick C, Martin JJ, Voit T, Schroder JM, Williams A, Brophy PJ, Timmerman V, Lupski JR (2002) *Periaxin* mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 51:709-715.
- Tao Y, Dai P, Liu Y, Marchetto S, Xiong WC, Borg JP, Mei L (2009) *Erbin* regulates *NRG1* signaling and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9477-9482.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) *Neuregulin-1* type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-694.
- Tersar K, Boentert M, Berger P, Bonneick S, Wessig C, Toyka KV, Young P, Suter U (2007) *Mtmr13/Sbf2*-deficient mice: an animal model for *CMT4B2*. *Hum Mol Genet* 16:2991-3001.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994) *Krox-20* controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371:796-799.

V

- Vartanian T, Goodearl A, Lefebvre S, Park SK, Fischbach G (2000) Neuregulin induces the rapid association of focal adhesion kinase with the erbB2-erbB3 receptor complex in schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271:414-417.
- Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN (2009) Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med* 7:70.
- Verheijen MH, Chrast R, Burrola P, Lemke G (2003) Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev* 17:2450-2464.
- Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, Schroder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den Bergh P, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic Rasic V, Nevo Y, Tournev I, Guergueltcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V (2006) MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129:2093-2102.
- Volpicelli-Daley L, De Camilli P (2007) Phosphoinositides' link to neurodegeneration. *Nat Med* 13:784-786.
- von Zastrow M, Sorokin A (2007) Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19:436-445.
- Vonderheit A, Helenius A (2005) Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* 3:e233.
- Voyvodic JT (1989) Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature* 342:430-433.

W

- Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U (2009) Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 4:e5160.
- Warren CM, Landgraf R (2006) Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18:923-933.
- Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y (1998) Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 273:13819-13827.
- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA. 1995. Pathophysiology of demyelinating axons. In: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK, editors. *The axon*. Oxford University Press. Pp 638-461.
- Webster HD (1971) The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J Cell Biol* 48:348-367.
- Whisstock JC, Lesk AM (1999) SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 24:132-133.
- Wishart MJ, Dixon JE (2002) PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol* 12:579-585.

Y

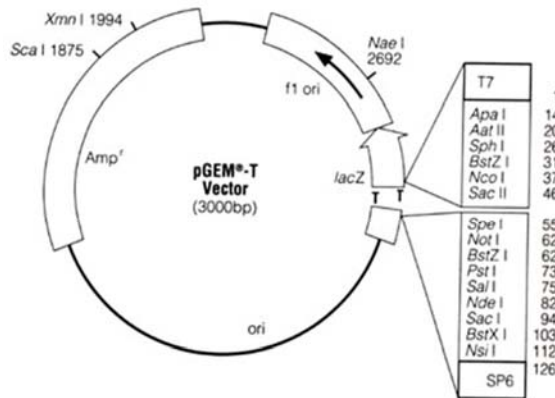
- Yang XL, Huang YZ, Xiong WC, Mei L (2005) Neuregulin-induced expression of the acetylcholine receptor requires endocytosis of ErbB receptors. *Mol Cell Neurosci* 28:335-346.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
- Yin X, Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, Trapp BD (2000) Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P(0) protein. *J Cell Biol* 148:1009-1020.

Z

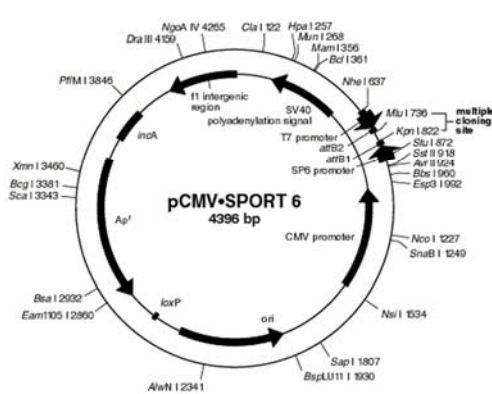
- Zhang Y, Zolov SN, Chow CY, Slutsky SG, Richardson SC, Piper RC, Yang B, Nau JJ, Westrick RJ, Morrison SJ, Meisler MH, Weisman LS (2007) Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17518-17523.
- Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, Scherer SS, Lemke G (1996a) The Transcription Factors SCIP and Krox-20 Mark Distinct Stages and Cell Fates in Schwann Cell Differentiation. *Mol Cell Neurosci* 8:129-145.
- Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, Scherer SS, Lemke G (1996b) The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* 8:129-145.
- Zorick TS, Syroid DE, Brown A, Gridley T, Lemke G (1999) Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* 126:1397-1406.
- Zuchner S (2010) Peripheral neuropathies: whole genome sequencing identifies causal variants in CMT. *Nat Rev Neurol* 6:424-425.
- Zuchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE, Walizada G, Zhu D, Pericak-Vance MA, Nicholson G, Timmerman V, Vance JM (2005) Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 37:289-294.

ANEXOS

Anexo I. Vectores de clonación y de expresión celular empleados en este trabajo.

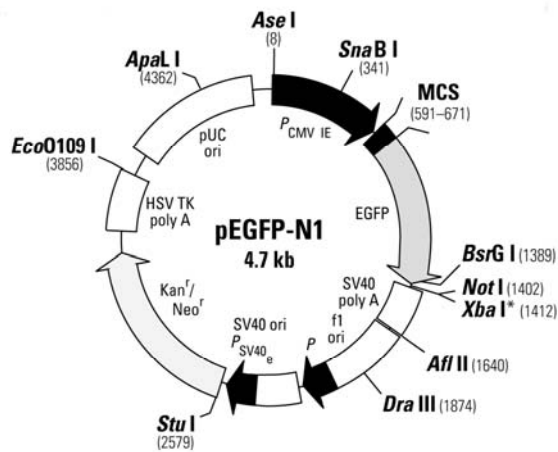


Vector pGEM-T (Promega): vector con sistema TA para clonar productos de PCR

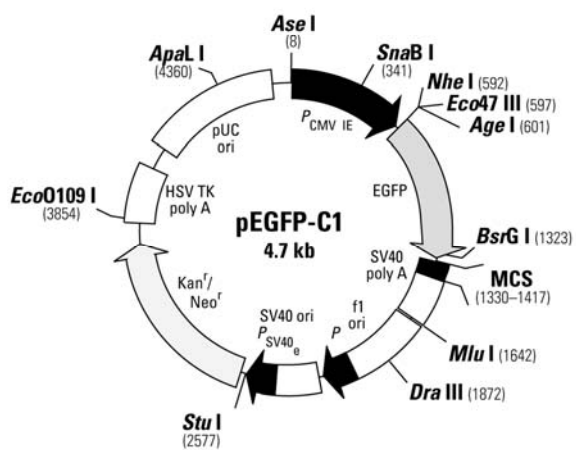


Vector pCMV-SPORT6 (GeneService Ltd): vector de expresión en células de mamíferos, que contenía los tres clones IMAGE empleados para la subclonación de *SH3TC2*

Anexo I (continuación).

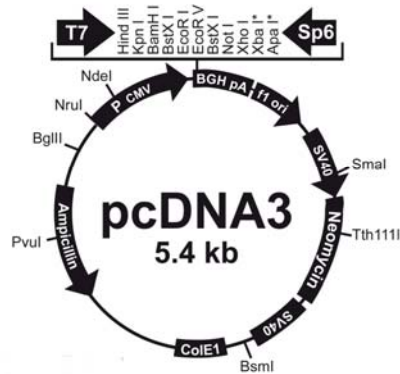


Vector pEGFP-N1 (Clontech):
vector de expresión en células de mamíferos, para expresar proteínas en pauta con la GFP en el extremo N-terminal

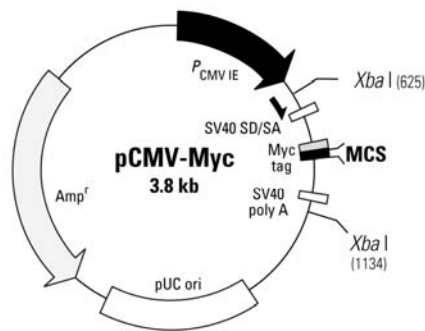


Vector pEGFP-C1 (Clontech):
vector de expresión en células de mamíferos, para expresar proteínas en pauta con la GFP en el extremo N-terminal

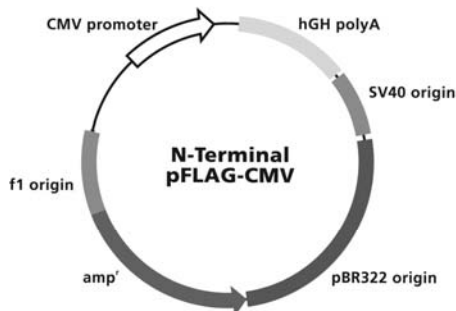
Anexo I (continuación).



Vector pcDNA3 (Clontech): vector de expresión en células de mamíferos, modificado para expresar proteínas en pauta con la etiqueta HA en el extremo C-terminal



Vector pCMV-Myc (Clontech): vector de expresión en células de mamíferos, para expresar proteínas en pauta con la etiqueta Myc en el extremo N-terminal

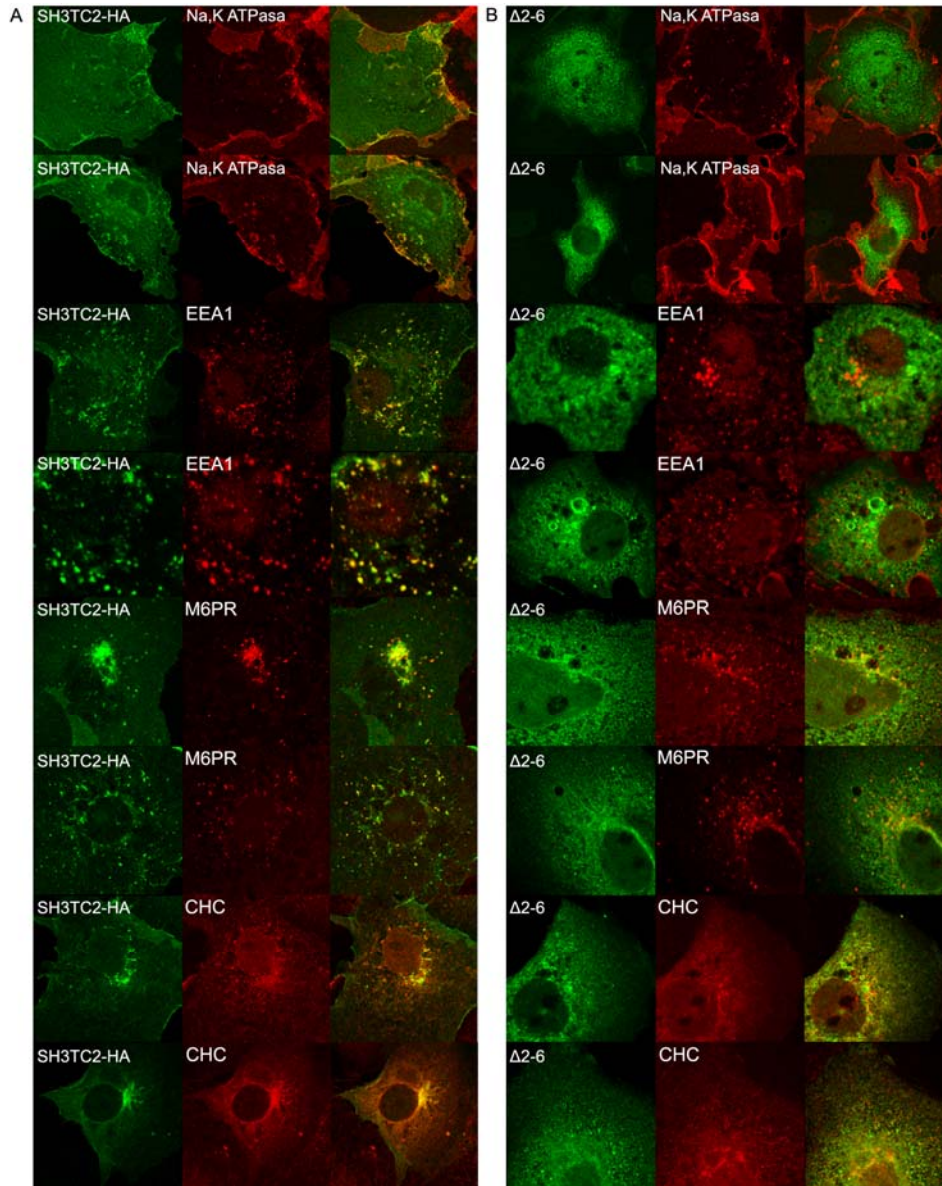


Vector pFLAG-CMV: vector de expresión en células de mamíferos, para expresar proteínas en pauta con la etiqueta FLAG en el extremo N-terminal

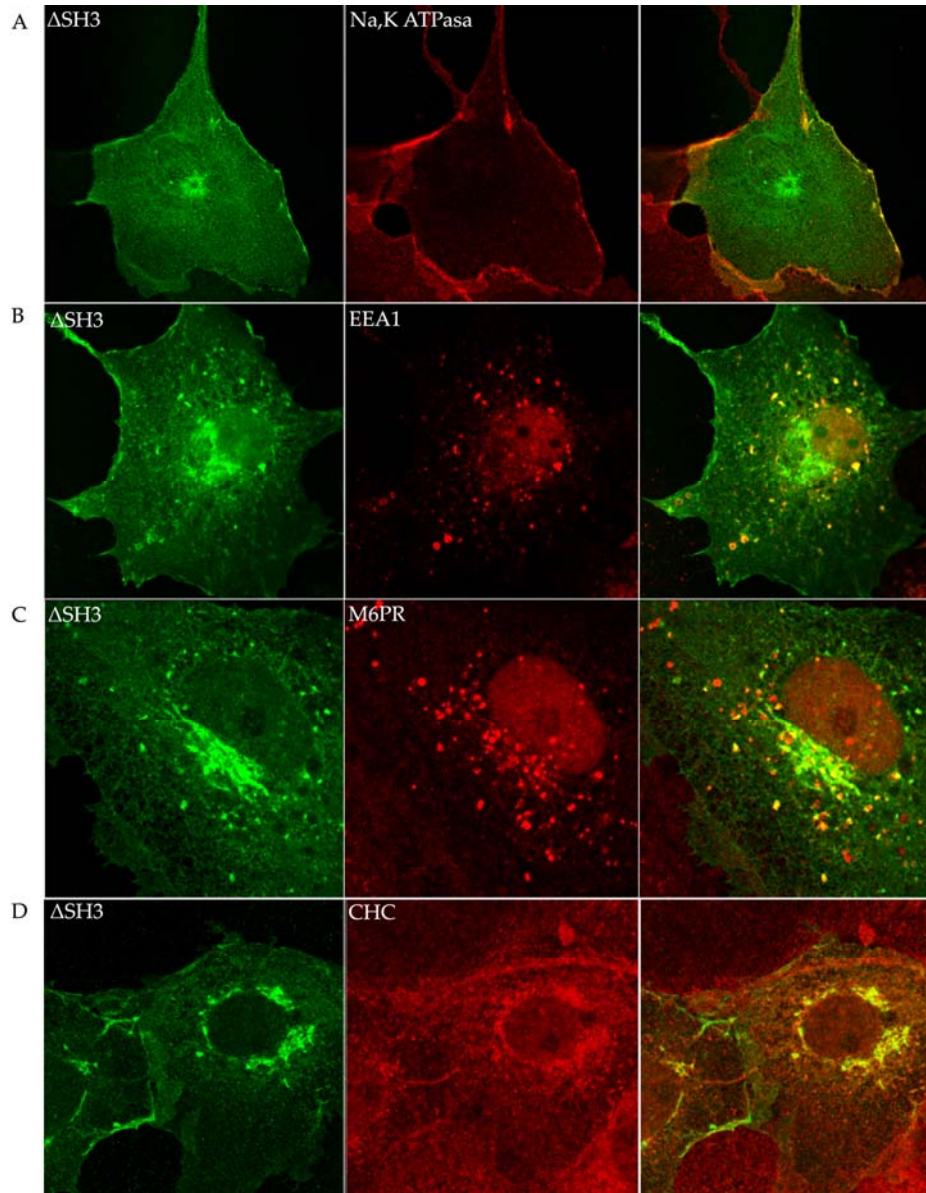
Anexo II. Cebadores empleados en este trabajo. Los nucleótidos subrayados representan el sitio de restricción indicado entre paréntesis. En rojo se especifica el cambio nucleotídico aportado a los cebadores para la mutagénesis dirigida.

Cebador	Sentido	Secuencia 5' – 3'
1	Directo	CCACCAGCCGAGAAGGAAGG
2	Reverso	GGACATTGGCATGGCCAGACT
3	Directo	GGAA <u>AGATCT</u> ATGGGTGGCTGCTTCTGCATCC-(BglII)
4	Reverso	GCGC <u>CCGCGG</u> TCTGGCCATGCCAAATGTCC-(SacII)
5	Directo	GGAA <u>AGATCT</u> ATGGGTGGCTGCTTCTGCATCC-(BglII)
6	Reverso	GCGC <u>CCGCGG</u> TACGAGGGCCAGGCCACCACC-(SacII)
7	Directo	GGAAGGT <u>ACC</u> ATGGGTGGCTGCTTCTGCATCC-(KpnI)
8	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGAGGGCCAGGCCACCACC-(EcoRV)
9	Directo	GGAAGA <u>AATTC</u> GGATGGGTGGCTGCTTCTGCATCC-(EcoRI)
10	Reverso	GCGC <u>GGTACC</u> GTCTGGCCATGCCAAATGTCC-(KpnI)
11	Directo	GGAAGGT <u>ACC</u> ATGCCAGGGAGCGGAGTCTGACC-(KpnI)
12	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGAGGGCCAGGCCACCACC-(EcoRV)
13	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGAAGTGGCCTTCTGTATCAGG-(EcoRV)
14	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGGATTCAAACCCACTGAGCC-(EcoRV)
15	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGGCCAAGGCAGAAACTTCACC-(EcoRV)
16	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> GATGCCTTAAGCCAAACAGCAATGC-(EcoRV)
17	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> GGTAGTACTCCACTGCATGATGC-(EcoRV)
18	Reverso	GCGC <u>GAATTC</u> GCCTTCTGTATCAGGAGTCC-(EcoRI)
19	Directo	GGAAGA <u>AATTC</u> TATTCCTCAATGAGCAGG-(EcoRI)
20	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGGATTCAAACCCACTGAGCC-(EcoRI)
21	Reverso	GCGC <u>GATATC</u> CGGCCAAGGCAGAAACTTCACC-(EcoRV)
22	Directo	AAGCTTGGTACCATGGC <u>T</u> GGCTGCTTCTGC
23	Reverso	ATGCAGAAGCAGCCAGCCATGGTACCAAGC
24	Directo	TTGGTACCATGGGTG <u>C</u> CTGCTTCTGCATCC
25	Reverso	GGGGATGCAGAAGCAGG <u>C</u> ACCCATGGTACC
26	Directo	CTGGGCCATGCC <u>A</u> TCTCTGCTTCC
27	Reverso	GAGGAAGCAGCGC <u>T</u> GGGCATGGGCCC
28	Directo	CTGCCCTTGGCC <u>A</u> AGCGCTGCAGC
29	Reverso	GAGCTGCAGGCGC <u>T</u> GGCAAAGGGC
30	Directo	TGCCCTTGGCGAG <u>T</u> GCCTGCAGCTCC
31	Reverso	GAGGAGCTGCAGG <u>C</u> ACTCGGCAAAGGG
32	Directo	GAGCACCCAGAGGG <u>A</u> CCTGTGTCTCATCC
33	Reverso	AAGGATGAGACACAGG <u>T</u> CCTCTGGGTGC
34	Directo	TGCATCAAGGAGAGCCTGCG
34	Directo	TTGGGACTCTGCAGCCATGG
35	Reverso	AGCCCAGGTATGACAAAGCC
36	Directo	CATTGACCTCAACTACATGG
37	Reverso	CAAAGTTGTCATGGATGACC
38	Directo	AGGTCTATTGTCGCCTTGGCC
39	Reverso	GGGCATCCTTCAGTTGGTAGAA

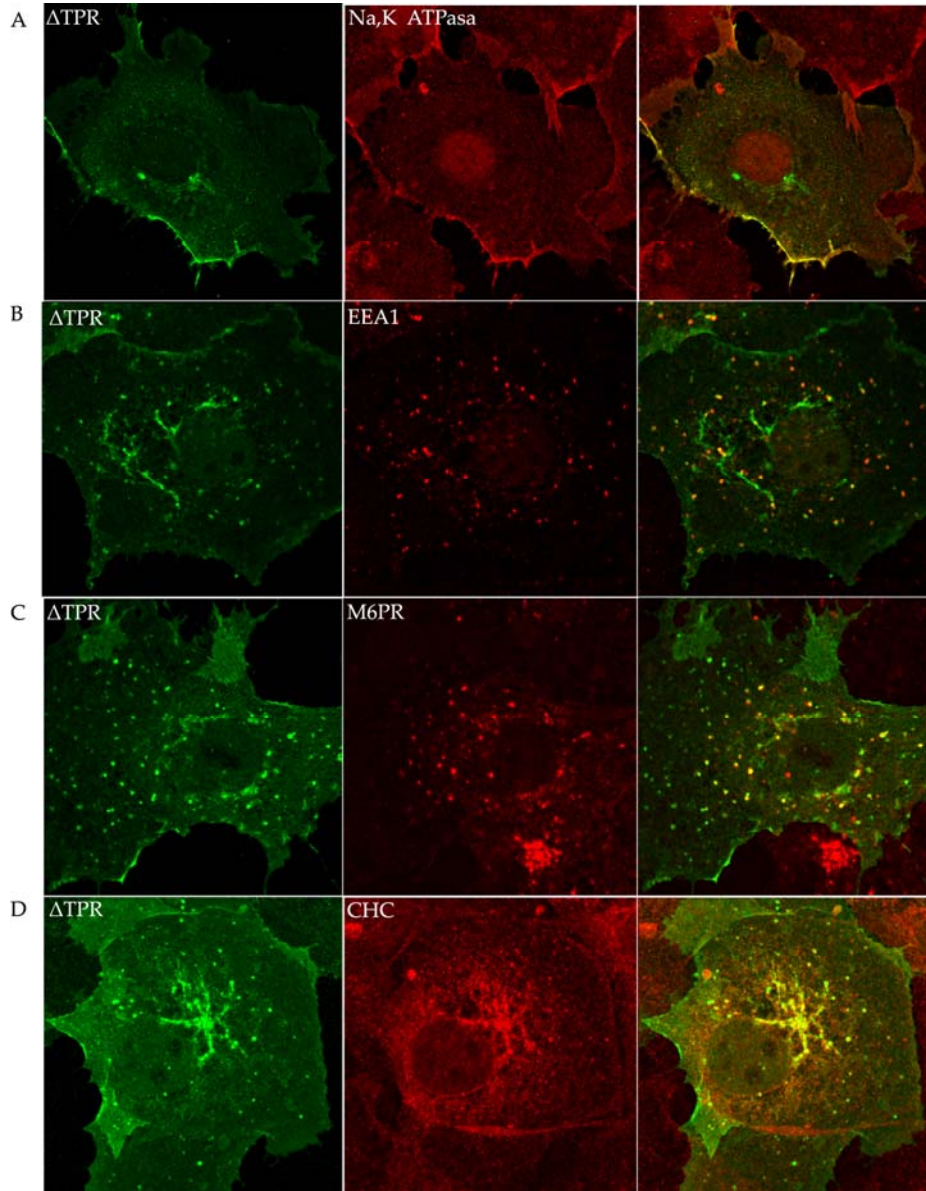
Anexo III. (A) Colocalización subcelular de SH3TC2, y (B) de su mutante carente del dominio de miristoilación $\Delta 2-6$ en células de COS-7 (ambos en el canal verde), con los marcadores de orgánulos anti-Na,K-ATPasa, anti-EEA1, anti-M6PR, y anti-CHC (mostrados en el canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.



Anexo IV-1. Efecto de la delección de los dominios SH3 sobre la localización de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con Δ SH3, se fijaron e inmunodetectaron con anti-HA (A-D, canal verde), y uno de los siguientes marcadores de orgánulos (canal rojo): anti-Na,K-ATPasa (A), anti-EEA1 (B), anti-M6PR (C), y anti-CHC (D). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

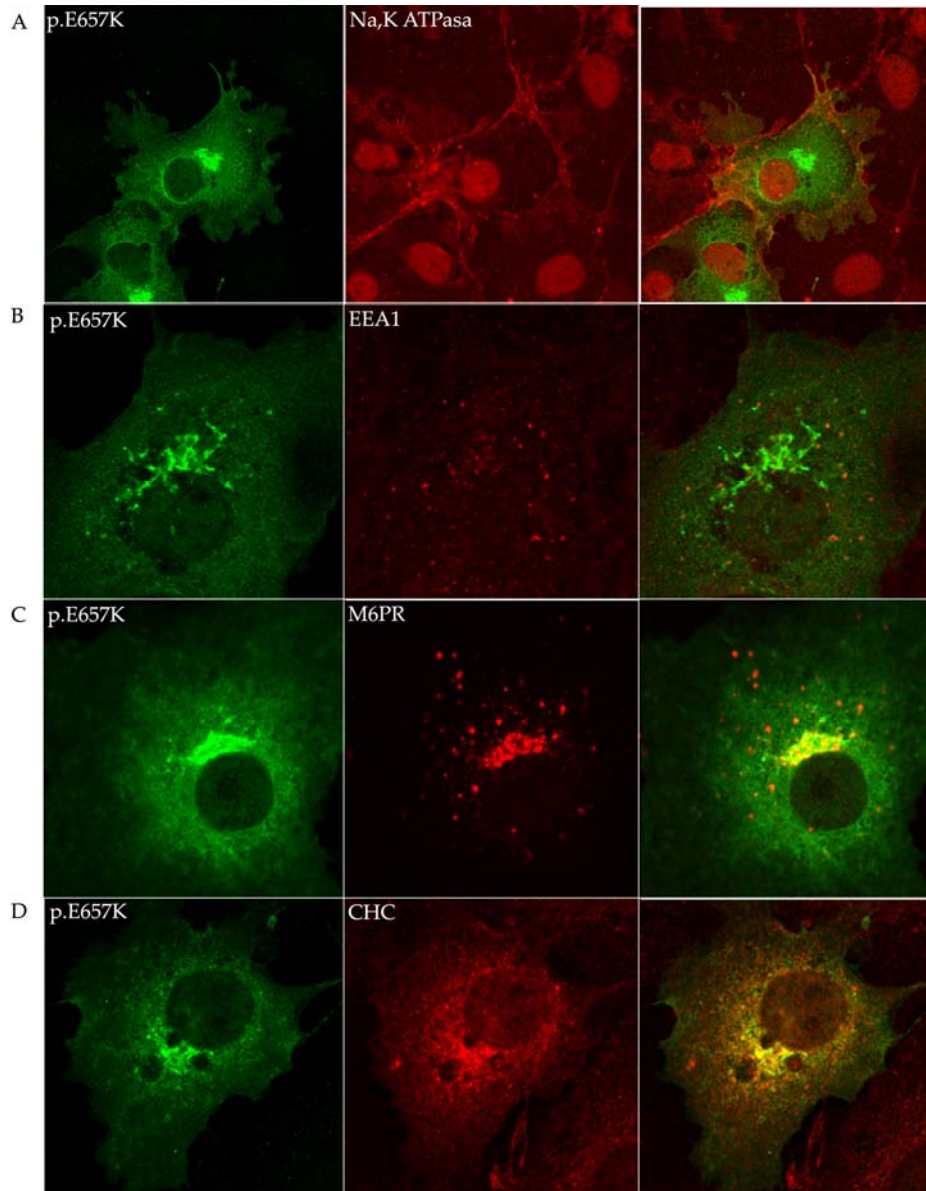


Anexo IV-2. Efecto de la delección de los dominios TPR sobre la localización de SH3TC2. Células COS-7, transfectadas con Δ TPR, se fijaron y inmunodetectaron con anti-HA (**A-D**, canal verde), y uno de los siguientes marcadores de orgánulos (canal rojo): anti-Na,K-ATPasa (**A**), anti-EEA1 (**B**), anti-M6PR (**C**), y anti-CHC (**D**). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.



Anexo V-1. . Efecto de las mutaciones p.E657K sobre la localización de SH3TC2.

p.E657K, fue sobreexpresada en células de COS-7, e inmunodetectada con anti-HA (A-D, canal verde). Además, anti-Na,K ATPasa (A), anti-EEA1 (B), anti-M6PR (C), y anti-CHC (D), se usaron como marcadores de orgánulos (canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.



Anexo V-2. . Efecto de las mutaciones p.R658C sobre la localización de SH3TC2. p.R658C, fue sobreexpresada en células de COS-7, e inmunodetectada con anti-HA (A-D, canal verde). Además, anti-Na,K ATPasa (A), anti-EEA1 (B), anti-M6PR (C), y anti-CHC (D), se usaron como marcadores de orgánulos (canal rojo). En el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes obtenidas con los diferentes canales.

