



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

DESARROLLO DE MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE DENT PARA  
LA IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS QUE  
SUBYACEN A LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

Tesis presentada por

**MÓNICA DURÁN FERNÁNDEZ**

Para optar al grado de Doctor

en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

en la **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**

Esta tesis se realizó en el Grupo de Fisiopatología Renal (CIBBIM-Nanomedicina) en el Institut de Recerca Vall d'Hebrón bajo la dirección de los doctores Anna Meseguer Navarro, Eduard Sarró Tauler y Gema Ariceta Iraola.

Febrero 2020

Directora y Tutora

Director

Directora

**Dra. Anna Meseguer Navarro**

**Dr. Eduard Sarró Tauler**

**Dra. Gema Ariceta Iraola**

**Candidata**

Mónica Durán Fernández



## Contenido

RESUMEN .....	19
INTRODUCCIÓN .....	25
INTRODUCCIÓN .....	27
1. EL RIÑÓN .....	27
1.1 Funciones del riñón .....	27
1.2 La nefrona y la formación de la orina.....	29
2. PROCESOS DE REABSORCIÓN EN EL TÚBULO PROXIMAL .....	35
2.1 Características morfológicas del túbulo proximal.....	35
2.2 Reabsorción de electrolitos en el túbulo proximal .....	36
2.2.1 Reabsorción de sodio .....	37
2.2.2 Reabsorción de calcio.....	38
2.2.3 Reabsorción del agua .....	39
2.3 Reabsorción de proteínas en el túbulo proximal .....	40
3. EL CANAL DE CLORO CLC-5.....	44
3.1 La familia de Canales de Cloro (CLC) .....	44
3.2 Canal de cloro 5 (CLC-5) .....	47
3.3 Interacciones proteicas con CLC-5 .....	49
4. ENFERMEDAD DE DENT.....	52
4.1 Descripción general y origen de la enfermedad de Dent.....	52
4.2 Manifestaciones clínicas .....	55
4.2.1 Proteinuria de bajo peso molecular (PBPM).....	57
4.2.2 Hipercalciuria.....	57
4.2.3 Nefrocalcinosis .....	58
4.3 Hallazgos histológicos en biopsias de pacientes .....	58
4.4 Diagnóstico genético .....	59
4.5 Tratamiento.....	59
4.6 Mutaciones patogénicas en el gen <i>CLCN5</i> causantes de la enfermedad de Dent de tipo 1.....	61
4.6.1 Gen <i>CLCN5</i> .....	61
4.6.2 Mutaciones en el gen <i>CLCN5</i> .....	62
4.7 Modelos de la enfermedad de Dent .....	64
4.7.1 Modelos celulares .....	64
4.7.2 Modelos animales KO.....	66
HIPÓTESIS.....	73

OBJETIVOS .....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
1. CULTIVO CELULAR .....	82
1.1 Líneas celulares .....	82
1.2 Condiciones de cultivo .....	83
1.3 Tripsinización.....	84
1.4 Recuento celular y siembra .....	84
1.5 Criopreservación .....	85
1.6 Descongelación celular.....	86
2. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES COMO MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE DENT.....	87
2.1 Silenciamiento del gen <i>CLCN5</i> en las líneas celulares RPTEC/TERT y HK-2	87
2.2 shRNA .....	87
3. GENERACIÓN DE MUTANTES .....	90
3.1 Clonación del gen <i>CLCN5</i> mediante el sistema Gateway .....	90
3.2 Purificación del DNA.....	91
3.3 Inserción cola de recombinación completa para su posterior recombinación.....	91
3.4 Reacción de recombinación BP .....	92
3.5 Mutagénesis sitio-dirigida .....	93
3.6 Diseño de cebadores .....	94
3.6.1 Mutaciones sinónimas o de rescate en el gen <i>CLCN5</i> .....	95
3.6.2 Mutaciones patogénicas en el gen <i>CLCN5</i> .....	96
3.6.3 Cebadores de secuenciación .....	96
3.7 Reacción de recombinación LR para expresar las formas CLC-5 WT y mutadas en un vector destino pLenti CMV Hygro DEST 117-1.....	97
4. MANIPULACIÓN BACTERIAS COMPETENTES.....	99
4.1 Transformación de bacterias competentes .....	99
4.2 Crecimiento de bacterias competentes .....	100
4.3 Identificación de colonias recombinantes .....	100
4.4 Almacenamiento de bacterias competentes .....	101
5. MANIPULACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	102
5.1 Aislamiento DNA plasmídico .....	102
5.2 Extracción RNA total.....	102
5.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos .....	103

5.4	Electroforesis en geles de agarosa .....	104
5.5	Transcripción inversa .....	105
5.6	PCR .....	105
5.7	RT-qPCR.....	106
5.8	Secuenciación.....	109
6.	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.....	110
7.	ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES TRANSDUCIDAS DE FORMA ESTABLE.....	112
7.1	Producción de partículas lentivirales .....	113
7.2	Transducción celular .....	114
8.	TÉCNICAS PROTEICAS.....	116
8.1	Extracción de proteínas.....	116
8.2	Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras .....	117
8.3	Análisis de proteínas por SDS-Page y Western Blot.....	118
8.4	Inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	121
9.	ENSAYOS FUNCIONALES.....	124
9.1	Ensayos de endocitosis.....	124
9.1.2	Ensayos de endocitosis mediante microscopia confocal .....	124
9.1.3	Ensayos de endocitosis mediante fluorometria.....	125
9.2	Tratamiento con Bafilomicina A-1.....	125
9.3	Ensayos de degradación <i>in vitro</i> . Tratamientos con cicloheximida	126
9.4	Determinación del estado de glicosilación .....	127
10.	MICROARRAYS DE RNA .....	127
10.1	Diseño experimental .....	128
10.2	Preparación de las muestras e hibridación .....	129
10.3	Control de calidad de las muestras .....	130
10.4	Pre-procesamiento de las muestras: normalización y filtrado ....	130
10.5	Selección de los genes diferencialmente expresados.....	131
10.6	Análisis de significancia biológica.....	132
11.	IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTEICAS POR TÉCNICAS DE ESPECTOMETRÍA DE MASAS.....	132
11.1	Ensayos de Co-inmunoprecipitación.....	132
11.2	Preparación de muestras y etiquetado TMT (Tandem mass tags)134	
11.3	Adquisición de datos de espectrometría de masas .....	135
11.4	Análisis de datos.....	136

11.5	Validación de los candidatos obtenidos.....	136
	RESULTADOS .....	141
1.	GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>CLCN5</i> .....	142
1.1	Silenciamiento del gen <i>CLCN5</i> en células RPTEC/TERT .....	144
1.2	Re-introducción del CLC-5 WT y mutado en células RPTEC/TERT con el <i>CLCN5</i> endógeno silenciado .....	145
2.	CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CLC-5 WT Y MUTADAS .....	150
2.1	Glicosilación de la proteína CLC-5 WT y mutadas.....	150
2.2	Efecto de las mutaciones en <i>CLCN5</i> en la estabilidad de la proteína CLC-5.	152
2.3	Localización subcelular del CLC5 WT y mutado. ....	153
3.	EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE <i>CLCN5</i> O LA RE-INTRODUCCIÓN DE CLC-5 WT Y MUTADO EN LA ENDOCITOSIS DE ALBÚMINA Y TRANSFERRINA.	157
3.1	Estudio de la endocitosis mediante microscopía confocal.....	157
3.2	Estudio de la endocitosis mediante fluorometría.....	162
4.	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN UN MODELOS HK-2	165
5.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>CLCN5</i> A TRAVÉS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA. ....	170
5.1	Análisis de calidad de los datos obtenidos del microarray .....	170
5.2	Descripción general del microarray .....	174
5.2.1	Efecto del silenciamiento y la re-introducción del CLC5 WT en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT.....	174
5.2.2	Efecto de la re-introducción de formas mutadas del CLC5 WT en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT.....	176
5.3	Validación de los resultados del microarray .....	177
5.4	Genes modulados por el silenciamiento de <i>CLCN5</i> .....	180
5.5	Impacto de la re-introducción del CLC5 WT en células previamente silenciadas .....	185
5.6	Impacto en la expresión génica de la re-introducción de formas mutantes de <i>clc5</i> en células previamente silenciadas para <i>clc5</i> .....	188
5.7	Impacto de la mutación p.V523del en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT .....	189

5.8	Impacto de la mutación p.E527D en la expresión génica .....	193
5.9	Impacto de la mutación p.I524K en el perfil de expresión génica de las células RPTEC/TERT.....	198
5.10	Elementos comunes entre las mutaciones estudiadas a nivel de expresión génica .....	199
6.	IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA CLC-WT Y MUTADA.....	201
6.1	Descripción general.....	201
6.2	Identificación de las interacciones con la proteína CLC- WT .....	206
6.3	Identificación de las interacciones con la proteína mutada V523del 208	
6.4	Identificación de las interacciones con la proteína mutada E527D 208	
6.5	Identificación de las interacciones con la proteína mutada I524K 209	
6.6	Identificación de las interacciones proteicas comunes con la forma WT y las formas mutadas .....	210
6.7	Validación de la interacción obtenida entre la proteína TMEM9 y CLC-5 WT o mutado.....	210
	DISCUSIÓN.....	216
1.	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>CLCN5</i> .....	217
2.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>CLCN5</i> A TRAVÉS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA. ....	225
3	IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA CLC-5 WT Y MUTADA.....	236





## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL RIÑÓN DERECHO HUMANO. ....	27
FIGURA 2. SEGMENTOS TUBULARES BÁSICOS DE LA NEFRONA <sup>1</sup> .....	30
FIGURA 3. ULTRAESTRUCTURA BÁSICA DE LOS CAPILARES GLOMERULARES. B. SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA MEMBRANA CAPILAR GLOMERULAR, SUS PRINCIPALES COMPONENTES: EL ENDOTELIO CAPILAR, LA MEMBRANA BASAL Y EL EPITELIO (PODOCITOS) <sup>1</sup> .....	32
FIGURA 4. FORMACIÓN DE LA ORINA A LO LARGO DE LA NEFRONA. ....	33
FIGURA 5. VÍAS DE REABSORCIÓN DE SOLUTOS A TRAVÉS DE LAS CÉLULAS DEL TÚBULO PROXIMAL <sup>1</sup> ..	37
FIGURA 6. MECANISMOS DE TRANSPORTE ACTIVO SECUNDARIO. LA CÉLULA SUPERIOR MUESTRA EL COTRANSPORTE DE GLUCOSA, JUNTO A LOS IONES DE SODIO. LA CÉLULA INFERIOR MUESTRA EL COTRANSPORTE DE IONES HIDROGENO, SIGUIENDO EL GRADIENTE ELÉCTRICO ESTABLECIDO POR LA BOMBA SODIO-POTASIO <sup>1</sup> .....	38
FIGURA 7. MECANISMOS DE REABSORCIÓN DE CALCIO POR LAS RUTAS PARACELULAR EN LAS CÉLULAS PROXIMALES <sup>1</sup> .....	39
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DEL COMPLEJO MACROMOLECULAR <sup>8</sup> .....	40
FIGURA 9. PROCESO DE ACIDIFICACIÓN ENDOSOMAL. MODIFICADO DE <sup>14</sup> .....	41
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO DE ENDOCITOSIS EN LAS CÉLULAS DEL TÚBULO PROXIMAL. MODIFICADO DE <sup>16</sup> .....	42
FIGURA 11. FAMILIA DE CANALES DE IONES CLORURO. MODIFICADO DE <sup>20</sup> .....	45
FIGURA 12. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PROTEÍNA CLC-5. MODIFICADO DE <sup>34</sup> .....	48
FIGURA 13. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA FUNCIÓN ALTERADA EN LA ENFERMEDAD DE DENT. MODIFICADO DE <sup>17</sup> .....	64
FIGURA 14. MAPA DE SECUENCIA COMPLETA DEL VECTOR pLKO.1-PURO QUE TRANSPORTA LOS DIFERENTES SHRNA CONTRA CLCN5. ....	89
FIGURA 15. MAPA DE SECUENCIA DEL VECTOR pDONOR <sup>TM221</sup> .....	93
FIGURA 16. DISEÑO DEL CEBADOR PARA EL MUTANTE DE "RESCATE" CLCN5.....	95
FIGURA 17. MAPA DE SECUENCIA COMPLETA DEL VECTOR pLENTI CMV HYGRO DEST (w117-1)..	98
FIGURA 18. MAPA DEL VECTOR pCMV6-ENTRY VECTOR.....	137
FIGURA 19. ESTRATEGIA EMPLEADA EN LA GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES .....	143
FIGURA 20. SILENCIAMIENTO DEL GEN CLCN5 ENDÓGENO EN LA LÍNEA CELULAR RPTEC/TERT..	145
FIGURA 21. SECUENCIACIÓN Y ALINEACIÓN DE LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA RPTEC/TERT	146
FIGURA 22. NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA CELULAR RPTEC/TERT MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS DE QRT-PCR. ....	148
FIGURA 23. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLC-5 EN LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA CELULAR RPTEC/TERT .....	149
FIGURA 24. BIOSÍNTESIS Y ESTADO DE GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS DE TIPO WT Y MUTANTES EXPRESADAS EN CÉLULAS RPTEC/TERT.....	151
FIGURA 25. LAS MUTACIONES PRESENTAN UNA MENOR ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA CLC-5.....	153
FIGURA 26. COLOCALIZACIÓN DE CLC-5 CON MEMBRANA PLASMÁTICA EN LAS CÉLULAS RPTEC/TERT1.. .....	154

FIGURA 27. CO-LOCALIZACIÓN DE CLC-5 CON RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN LAS CÉLULAS RPTEC/TERT1. ....	155
FIGURA 28. CO-LOCALIZACIÓN DE CLC-5 CON ENDOSOMA TEMPRANO EN LAS CÉLULAS RPTEC/TERT1. ....	156
FIGURA 29. EFECTO DE LAS MUTACIONES Y DEL SILENCIAMIENTO DE CLCN5 EN LA CAPTACIÓN DE ALBÚMINA EN LAS LÍNEAS CELULARES RPTEC/TERT. ....	159
FIGURA 30. EFECTO DE LAS MUTACIONES Y DEL SILENCIAMIENTO DE CLCN5 EN LA CAPTACIÓN DE TRANSFERRINA EN LAS LÍNEAS CELULARES RPTEC/TERT. ....	161
FIGURA 31. ENDOCITOSIS DE ALBÚMINA EN LAS CÉLULAS RPTEC/TERT. ....	163
FIGURA 32. ENDOCITOSIS DE ALBÚMINA EN LAS CÉLULAS RPTEC/TERT EN PRESENCIA DE BAFILOMICINA-A1. ....	164
FIGURA 33. SILENCIAMIENTO DEL GEN CLCN5 ENDÓGENO EN LA LÍNEA CELULAR HK-2. RT-QPCR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CLCN5 DESPUÉS TRANSDUCIR LA LÍNEA CÉLULAR HK-2 CON LOS DIFERENTES SHRNA. ....	165
FIGURA 34. SECUENCIACIÓN Y ALINEACIÓN DE LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA HK-2. ....	166
FIGURA 35. NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA CELULAR HK-2 MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS DE QRT-PCR. ....	167
FIGURA 36. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLC-5 EN LOS MUTANTES CLCN5 EN LA LÍNEA CELULAR HK-2. ....	168
FIGURA 37. EFECTO DE LAS MUTACIONES Y DEL SILENCIAMIENTO DE CLCN5 EN LA CAPTACIÓN DE ALBÚMINA EN LAS LÍNEAS CELULARES HK-2. I. ....	169
FIGURA 38. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) 171	
FIGURA 39. DESVIACIONES ESTÁNDAR DE TODOS LOS GENES DEL MICROARRAY. ....	172
FIGURA 40. DIAGRAMA DE VENN DE LAS COMPARACIONES MÚLTIPLES ENTRE WT VS SHCLC5 Y SHCLC5 VS SHØ. ....	175
FIGURA 41. DIAGRAMA DE VENN DE LAS COMPARACIONES MÚLTIPLES ENTRE P.V523DEL VS WT, P.E527D VS WT E P.I524K VS WT. ....	177
FIGURA 42. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MICROARRAYS EN LA LÍNEA CELULAR RPTEC/TERT POR RT-QPCR. ....	179
FIGURA 43. REPRESENTACIÓN DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA LAS CONDICIONES CONTROL Y SILENCIAMIENTO DE CLCN5 MEDIANTE HEATMAPS. ....	180
FIGURA 44. FUNCIONES MOLECULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN SHCLC5 VS SHØ. ...	182
FIGURA 45. PROCESOS BIOLÓGICOS ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN SHCLC5 VS SHØ. A) GRÁFICAS DE PUNTOS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS (BP).....	183
FIGURA 46. COMPONENTES CELULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN SHCLC5 VS SHØ ....	184
FIGURA 47. REPRESENTACIÓN DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA COMPARACIÓN P.V523DEL VS WT, P.E527D VS WT, P.I524K VS WT MEDIANTE HEATMAPS.....	188
FIGURA 48. FUNCIONES MOLECULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN V523DEL VS RCLC5 WT. ....	191
FIGURA 49. PROCESOS BIOLÓGICOS ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN V523DEL VS RCLC5 WT. ....	192
FIGURA 50. COMPONENTES CELULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN V523DEL VS RCLC5 WT.....	193

FIGURA 51. FUNCIONES MOLECULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN E527DDEL VS RCLC5 WT.....	195
FIGURA 52. PROCESOS BIOLÓGICOS ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN E527D VS RCLC5 WT. A) GRÁFICAS DE PUNTOS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS (BP).....	196
FIGURA 53. COMPONENTES CELULARES ENCONTRADOS EN LA COMPARACIÓN E527D VS RCLC5 WT. ....	197
FIGURA 54. REPRESENTACIÓN DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS MEDIANTE HEATMAPS.....	204
FIGURA 55. INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA TMEM9 Y LAS FORMAS CLC-5WT Y MUTADAS..	214
FIGURA 56. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PROTEÍNA CLC-5.....	218



## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. LOCALIZACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROTEÍNAS CLC DE MAMÍFEROS Y SUS PATOLOGÍAS ASOCIADAS. MODIFICADO DE <sup>20</sup> .	46
TABLA 2. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE DENT. COHORTE DE 109 PACIENTES MASCULINOS CON MUTACIONES CLCN5 (DENT-1) Y 9 PACIENTES CON MUTACIÓN DEL GEN OCRL (DENT-2). MODIFICADO <sup>80</sup> .	56
TABLA 3. TRANSCRITOS DEL GEN CLCN5	61
TABLA 4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE DENT EN UN MODELO KO PARA CLC-5. MODIFICADO DE <sup>14</sup>	67
TABLA 5. MEDIO DE COMPOSICIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES RPTEC/TERT1 Y HK-2.	83
TABLA 6. SECUENCIAS DE SHRNA UTILIZADAS EN EL SILENCIAMIENTO DE CLCN5.	88
TABLA 7. DISEÑO DE CEBADORES UTILIZADOS EN EL CLONAJE DE CLCN5.	90
TABLA 8. DISEÑO DE CEBADORES UTILIZADOS EN EL CLONAJE DE CLCN5.	92
TABLA 9. DISEÑO DE CEBADORES PARA INTRODUCIR LAS MUTACIONES SINÓNIMAS EN EL GEN CLCN5 A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE MUTAGÉNESIS DE SITIO DIRIGIDO.	95
TABLA 10. DISEÑO DE CEBADORES PARA INTRODUCIR LAS MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN CLCN5 A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE MUTAGÉNESIS DE SITIO DIRIGIDO.	96
TABLA 11. CEBADORES DISEÑADOS PARA LA SECUENCIACIÓN DEL VECTOR PDONOR 221 Y PLENTI CMV.	97
TABLA 12. LISTA DE CEBADORES PARA RT-QPCR SYBR <sup>®</sup> GREEN	108
TABLA 13. LISTA DE SONDAS TAQMAN <sup>®</sup> PARA RT-QPCR UTILIZADAS EN LA VALIDACIÓN DEL MICROARRAY	108
TABLA 14. ESTÁNDAR DE ALBÚMINA	117
TABLA 15. CONCENTRACIÓN DE POLIACRILAMIDA UTILIZADA EN LOS GELES SEGÚN LA MEDIDA DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS.	119
TABLA 16. VOLUMEN NECESARIO PARA LA PREPARACIÓN DE 2 GELES PARA SDS-PAGE.	120
TABLA 17. LISTADO DE ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA INMUNODETECCIÓN PARA WESTERN BLOT.	120
TABLA 18. LISTADO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA LA INMUNODETECCIÓN PARA INMUNOCITOQUÍMICA	122
TABLA 19. LISTADO DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA LA INMUNODETECCIÓN PARA INMUNOCITOQUÍMICA	123
TABLA 20. CONDICIONES EXPERIMENTALES UTILIZADAS EN EL MICROARRAY	128
TABLA 21. COMPONENTES TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.	138
TABLA 22. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES GENERADAS. EL SÍMBOLO $\emptyset$ CORRESPONDE AL VECTOR VACÍO Y SHCLC5 CORRESPONDE AL VECTOR DE SILENCIAMIENTO. EL VECTOR DE EXPRESIÓN PUEDE CONTENER LA FORMA CLC5 WT O LAS MUTACIONES V523DEL, E527D O I524K.	173
TABLA 23. VALORES DE LOGFC DE CLCN5	174
TABLA 24. IMPACTO DEL SILENCIAMIENTO Y EN LA RE-INTRODUCCIÓN DEL GEN CLCN5 (P VALOR AJUSTADO <0.05, VALOR ABSOLUTO DE LOGFC > 0.5)	175

TABLA 25. IMPACTO DE LAS MUTACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS COMPARACIONES DESCRITAS. (P VALOR AJUSTADO <0.05, VALOR ABSOLUTO DE LOGFC > 0.5).....	176
TABLA 26. VALORES LOGFC DE ALGUNOS GENES OBTENIDOS EN EL MICROARRAY PARA CADA UNA DE LAS COMPARACIONES INDICADAS. ....	178
TABLA 27. LOS 30 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA COMPARACIÓN SHCLC5 VS SHØ. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y VALOR ABSOLUTO LOGFC>0.5.....	181
TABLA 28. LOS 15 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS COMPARACIONES WT VS SHCLC5 Y SHCLC5 VS SHØ. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y LOGFC>0.5.....	186
TABLA 29. LOS 15 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS COMPARACIONES WT VS SHCLC5 Y SHCLC5 VS SHØ. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y LOGFC>0.5.....	187
TABLA 30. LOS 30 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA COMPARACIÓN DEL MUTANTE P.V523DEL VS RCLC5WT. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y LOGFC>0.5. ....	190
TABLA 31. LOS 30 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA COMPARACIÓN DEL MUTANTE P.E527D VS RCLC5WT. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y LOGFC>0.5. ....	194
TABLA 32. LOS 21 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA COMPARACIÓN DEL MUTANTE P.I524K VS RCLC5WT. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y LOGFC ABSOLUTO>0.5 .....	198
TABLA 33. GENES COMUNES EN LAS TRES MUTACIONES ESTUDIADAS. ADJ.P.VALUE < 0.05 Y VALOR ABSOLUTO LOGFC >0.5 .....	199
TABLA 34. INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA CLC-5 WT. ....	206
TABLA 35. INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA MUTADA V523DEL.....	208
TABLA 36. INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA MUTADA E527D .....	209
TABLA 37. INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA MUTADA I524K.....	209
TABLA 38. INTERACCIONES PROTEÍCAS CON LA FORMA CLC-5 WTY LAS MUTACIONES P.V523DEL, P.E527D Y P.I524K. ....	210





## ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
ARA:	Receptores de Angiotensina
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP:	Adenosin Trifosfato
BCA:	<i>Bicinchoninic Acid</i>
CBS:	Cistationina $\beta$ -Sintetasa
CBS1 y CBS2:	Cistationina $\beta$ -Sintetasa 1 y 2
CC:	Componentes Celulares
cDNA:	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CHX:	<i>Cycloheximide</i>
CLC:	Canal de cloro
CLC5:	Canal de cloro 5
CT:	<i>Threshold Cycle</i>
DBP:	D site-binding protein
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dsDNA:	<i>Double-stranded Deoxyribonucleic Acid</i>
dsRNA:	<i>Double-stranded Ribonucleic Acid</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMBL:	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
Endo H:	Endoglicosidasa H
Epítipo HA:	<i>Human Influenza Hemagglutinin</i>
ERC:	Enfermedad Renal Crónica
ESDR:	<i>End Stage Renal Disease</i>

FB:	Funciones Biológicas
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
FM:	Funciones Moleculares
GlcNac:	<i>N-Acetylglucosamine</i>
GO:	<i>Gene Ontology</i>
HEK:	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HK-2:	<i>Human Kidney 2</i>
HPV16:	Virus del Papiloma Humano
HRP:	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
hTERT:	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
HUVH:	Hospital Universitario Vall d'Hebrón
ICC:	Inmunocitoquímica
IECA:	Enzima Convertidora de Angiotensina
KDa:	Kilodalton
KI:	<i>Knock-In</i>
KIF3B:	<i>Kinesin Family Member 3B</i>
KO:	<i>Knockout</i>
LB:	Luria-Bertani
logFC:	<i>Fold Change</i>
LTR:	<i>Long terminal repeat</i>
miRNAs:	<i>micro Ribonucleic Acid</i>
mRNA:	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NaPi-IIa:	<i>Type II Sodium-phosphate Co-transporter</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NH3:	Isoforma 3 del intercambiador sodio-protón
NHERF2:	Factor-2 regulador de intercambio Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>
OCRL1:	<i>Lowe Oculocerebrorenal Syndrome Protein</i>
PBPM:	Proteinuria de Bajo Peso Molecular
PCA:	<i>Principal component analysis</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI:	<i>Polyethylenimine</i>
PNGasa F:	<i>Peptide-N-Glycosidase F</i>
PTH:	<i>Parathyroid hormone</i>
QC:	<i>Quality Control</i>
RNAi:	<i>Ribonucleic Acid interference</i>
RPTEC/TERT:	<i>Renal Proximal Tubule Epithelial Cells</i>
RT:	<i>Room Temperature</i>
RT-qPCR:	<i>Quantitative Reverse Transcription</i>
	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SDS:	Sulfato de Sodio
shRNAs:	<i>Short hairpin Ribonucleic Acid</i>
siRNAs:	<i>Small interfering Ribonucleic Acid</i>
T3:	<i>Triiodo-L-Thyronine</i>
Ta:	Temperatura de alineamiento
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
TGF:	Tasa Filtración Glomerular
TMT:	<i>Tandem Mass Tags</i>
UAT:	Unidad de Alta Tecnología
V-ATPasa:	bomba de protones
VSV-G:	<i>Vesicular stomatitis virus G</i>

# RESUMEN



La enfermedad de Dent de tipo 1 es un trastorno hereditario poco frecuente caracterizado por proteinuria de bajo peso molecular (PBPM), hipercalcemia y nefrocalcinosis que progresa a enfermedad renal terminal. Es una enfermedad provocada por mutaciones en el gen *CLCN5* que codifica para el canal de cloro ClC-5, el cual está expresado principalmente en el túbulo proximal. En la actualidad, no existen tratamientos específicos ni ensayos clínicos activos y el cuidado es de soporte para esta enfermedad.

Mutaciones en el gen *CLCN5* provocan un defecto en el tráfico en los receptores y transportadores apicales y como consecuencia, se compromete el proceso de endocitosis. A pesar de que se conoce el efecto primario de estas mutaciones, se desconoce el efecto de las mismas sobre otras funciones propias de las células del túbulo proximal que, de forma secundaria, podrían tener un impacto sobre la función tubular y, en consecuencia, en la función renal. Postulamos que el descubrimiento de redes génicas y procesos celulares que puedan alterarse como consecuencia de mutaciones en el gen *CLCN5* deberían proveer información relevante sobre la fisiopatología de la enfermedad de Dent a nivel tubular.

Con el fin de identificar el impacto del silenciamiento y de determinadas mutaciones en el gen *CLCN5* sobre procesos, todavía por identificar, en las células del túbulo proximal renal, generamos líneas celulares derivadas del túbulo proximal humano (RPTEC/TERT y HK-2) con el gen *CLCN5* silenciado o portadoras de las mutaciones p.I524K, p.E527D y p.V523del en *CLCN5*. La elección de estas mutaciones se ha hecho en base a que la mutación p.V523del se ha encontrado en un paciente que presenta unas manifestaciones clínicas muy acusadas que la gran mayoría de pacientes. Las otras mutaciones son igualmente de interés ya que, aunque han sido previamente descritas a nivel electrofisiológico, se encuentran contiguas en la secuencia proteica y podrían

aportar información muy relevante en el desarrollo de la enfermedad. En los modelos celulares obtenidos tras el silenciamiento y re-expresión de las formas WT y mutadas de *CLCN5*, evaluamos los niveles de expresión del gen *CLCN5* endógeno y exógeno a nivel de mRNA, y los niveles de expresión, localización sub-celular, estado de glicosilación y vida media de la proteína CLC-5 WT y de las diferentes formas mutadas, así como la capacidad endocítica de cada una de las líneas.

Una vez validados los modelos celulares, se estudió el impacto producido por el silenciamiento de *CLCN5* y de las distintas mutaciones en el perfil de expresión génica de las células RPTEC mediante ensayos de microarrays. Los resultados obtenidos indican que el silenciamiento de *CLCN5* altera funciones moleculares relacionadas con la unión a proteínas, la unión a aniones, la unión a receptores de señalización, y procesos biológicos tales como la diferenciación celular y la regulación de la comunicación celular. Fue muy interesante observar que la reintroducción del gen CLC-5 WT en las células previamente silenciadas revertía con signo distinto la expresión de 381 genes previamente modificados por el silenciamiento de *CLCN5*.

La comparación del patrón de expresión de las distintas mutaciones entre ellas y con la forma WT reveló el gran impacto producido por la mutación p.V523del en el modelo celular RPTEC/TERT. Los cambios en la expresión génica inducidos por este mutante se relacionan con procesos biológicos tales como el ciclo celular, la morfogénesis y el desarrollo del túbulo renal. Esta mutación ha sido descrita en sólo tres pacientes en todo el mundo. El único paciente descrito en España es visitado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron y muestra unas características clínicas muy acusadas de la enfermedad, lo que sugiere una relación de esta mutación con un fenotipo más agresivo que podría explicarse, en parte, por el fuerte impacto sobre la expresión génica observado en el modelo celular.

En este trabajo hemos identificado nuevas interacciones proteicas asociadas a la forma WT o a las distintas mutaciones de *CLCN5a* través de técnicas de co-inmunoprecipitación combinada con el análisis de espectrometría de masas. La identificación de nuevas interacciones de CLC-5 con proteínas cuya función es conocida puede ayudar a esclarecer en gran medida el papel exacto de CLC-5 en las células del túbulo proximal. Es mas, identificar la función de las proteínas que interactúan de forma común o bien específicamente con el CLC-5 wild-type y/o mutado podría ayudar a entender mejor los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Dent.

Los resultados de esta tesis han aportado nueva información sobre los mecanismos que subyacen a la enfermedad de Dent y deberían ser de utilidad para el descubrimiento de dianas y soluciones terapéuticas capaces de prevenir la progresión de la enfermedad y el fallo renal terminal para esta enfermedad y, eventualmente, para otras enfermedades relacionadas con el síndrome de Fanconi.





# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. EL RIÑÓN

Los riñones son los órganos principales del sistema urinario humano y se localizan en la parte posterior del peritoneo, junto a la columna vertebral (Figura 1).

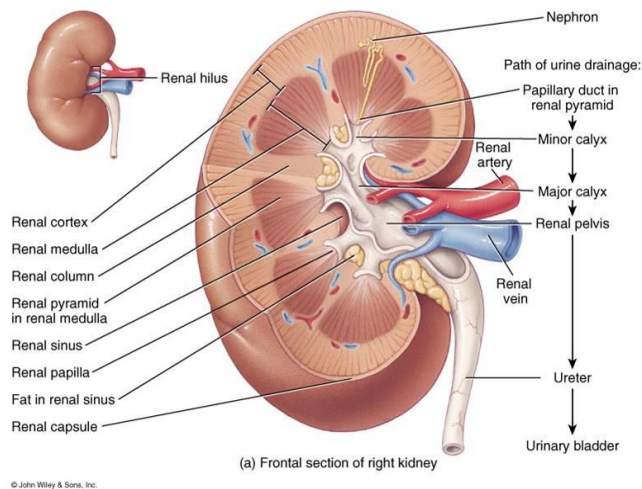


Figura 1. Anatomía del riñón derecho humano.

Cuando se observa un corte de un riñón hemiseccionado, se pueden distinguir a simple vista dos zonas: la corteza, o parte externa, y la médula renal, o parte interna. La médula, está formada por unidades de aspecto cónico, denominadas pirámides medulares. La unidad morfo-funcional del riñón se denomina lóbulo renal y está constituida por una pirámide medular con su corteza renal asociada.<sup>1,2</sup>

#### 1.1 Funciones del riñón

Los riñones desarrollan funciones básicas y vitales para el organismo. Estas funciones se pueden agrupar en tres categorías principales: excretora, endocrina y homeostática:

- La función excretora consiste en eliminar productos tóxicos exógenos (fármacos y toxinas) y productos de desecho del metabolismo (amoníaco, urea, bilirrubina, creatinina, entre otros)<sup>3</sup>.
  
- La función endocrina se basa en la síntesis y liberación de hormonas como el calcitriol, la eritropoyetina y la renina. El calcitriol es la forma activa de la vitamina D, que ayuda a regular la homeostasis de calcio, esencial para el depósito de calcio en los huesos y la absorción del mismo en el tubo digestivo. La eritropoyetina estimula la producción de eritrocitos, mientras que la secreción de la enzima renina (que cataliza el paso de angiotensinógeno a angiotensina II) regula y mantiene la presión sanguínea. Además, el riñón también puede responder a estímulos hormonales, algunos de ellos relacionados con la regulación del transporte de solutos, como por ejemplo la aldosterona. La aldosterona, secretada por las células de la corteza suprarrenal, es un regulador positivo de la reabsorción de Na<sup>+</sup> y la secreción de K<sup>+</sup> en los túbulos renales, estimulando la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en las células del túbulo colector<sup>3</sup>.
  
- La función homeostática -consiste en la regulación del agua y solutos para mantener la osmolaridad correcta de los fluidos corporales mediante la formación de orina. El riñón regula la composición iónica presente de forma normal en los fluidos del organismo, principalmente de los iones sodio, potasio, calcio, cloro y fosfato. También participa en la regulación del equilibrio ácido-base mediante la excreción de H<sup>+</sup> en la orina y la retención de iones bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), un importante amortiguador de H<sup>+</sup>. Otra función destacable consiste en la regulación de la concentración de glucosa en sangre. Por ejemplo, en situaciones de ayuno prolongado, los riñones pueden desaminar el aminoácido glutamina y sintetizar nuevas moléculas de glucosa para su liberación en la sangre<sup>3</sup>.

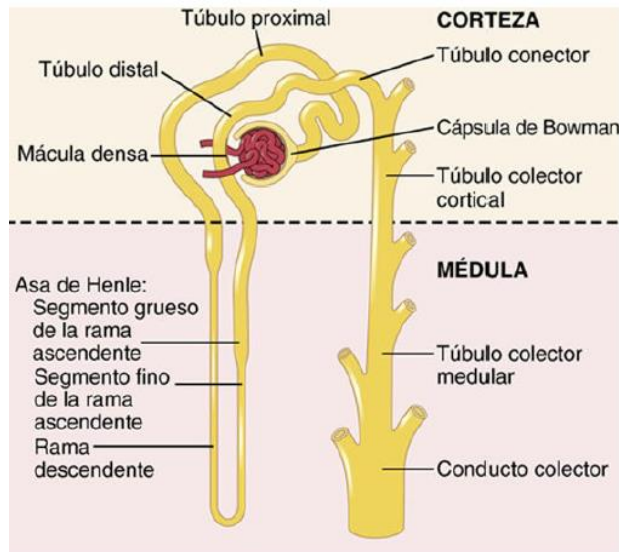
Las funciones reguladora y excretora, se llevan a cabo mediante la formación y eliminación de orina de composición adecuada como respuesta a las necesidades del organismo. Los procesos que incluyen la reabsorción de agua y solutos, así como la excreción de productos tóxicos para las células, y el procesamiento de cantidades elevadas de ultrafiltrado, requieren una alta demanda de energía por lo que este órgano necesita mantener una elevada producción energética. Por lo anterior, existe una estrecha relación entre el transporte renal y el metabolismo, de manera que éste último está acoplado a la producción de energía para llevar a cabo los procesos metabólicos celulares. El riñón obtiene la energía necesaria a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial utilizando como sustratos ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, lactato o glutamina<sup>2</sup>.

En pacientes con enfermedades renales crónicas o en la insuficiencia renal aguda, estas funciones excretoras, endocrinas y homeostáticas se ven alteradas, lo que produce cambios importantes en los volúmenes y en la composición de líquidos corporales. Cuando la función renal disminuye en el organismo, normalmente se produce una retención de potasio, ácidos, líquido y sustancias de desecho que, de no iniciar una terapia para restablecer la función renal, puede desencadenar la muerte<sup>3</sup>.

## 1.2 La nefrona y la formación de la orina

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Figura 2). En un hombre adulto, existen aproximadamente un millón de nefronas que son capaces de filtrar aproximadamente 150 litros diarios de sangre. La nefrona está constituida principalmente por el corpúsculo renal, el aparato yuxtglomerular, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal.

A nivel funcional, la nefrona se divide en diferentes segmentos. Cada segmento desempeña determinadas funciones que están condicionadas por los genes que expresan.



*Figura 2. Segmentos tubulares básicos de la nefrona<sup>1</sup>*

La formación de la orina es el resultado de tres procesos diferenciados: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular.

1. El paso inicial en la formación de la orina consiste en la ultrafiltración del plasma sanguíneo en el corpúsculo renal. El filtrado glomerular es un ultrafiltrado de plasma virtualmente libre de proteínas, que consiste básicamente de una solución constituida por un solvente que es el agua, y por solutos de dos clases químicas principales: iones orgánicos y solutos orgánicos de bajo peso molecular, con concentraciones iniciales a nivel del seno de Bowman e inicio del túbulo contorneado proximal muy similares a las del plasma. La barrera de filtración del corpúsculo renal no pone obstáculos al paso de moléculas cuyos pesos moleculares son menores de 7000 Dalton, las

cuales se filtran con gran avidez. Comprende iones pequeños, glucosa, urea, toxinas procedentes de desechos metabólicos, aminoácidos y hormonas. En el caso de las moléculas cuyo peso molecular varía de 7000 a 70000 Dalton, la cantidad filtrada es cada vez más pequeña conforme la molécula se torna más grande. La carga eléctrica es la segunda variable de la que depende la capacidad de filtración de macromoléculas. Para cualquier tamaño determinado, las macromoléculas con carga negativa se filtran en menor extensión y las de carga positiva, en mayor extensión. El corpúsculo renal está constituido por el glomérulo y la cápsula glomerular o de Bowman (Figura 3). La capsula de Bowman es una cubierta membranosa formada por células epiteliales aplanadas que envuelve al glomérulo y corresponde al inicio del túbulo proximal. El glomérulo es un ovillo de capilares sanguíneos fenestrados unidos por tejido conectivo y revestido por una capa de células llamadas podocitos. Estas células presentan prolongaciones, llamadas pedicelos, y forman la capa visceral de la capsula de Bowman. En el polo vascular del glomérulo encontramos una estructura macroscópica que consiste en el aparato yuxtglomerular. Esta estructura está formada por una porción de la arteriola aferente y su función principal es regular la presión arterial a través del control del eje renina angiotensina, fundamental para mantener la homeostasis corporal. La sangre entra en el glomérulo por la arteriola aferente, atraviesa la red de capilares y sale por la arteriola eferente de diámetro menor. Debido a la presión hidrostática en los capilares glomerulares, parte de las moléculas pequeñas disueltas en el plasma sanguíneo y parte del agua puedan pasar al espacio capsular y el filtrado glomerular es conducido hacia el túbulo renal. La barrera de filtración entre la luz del capilar y el espacio de Bowman está formada por el endotelio capilar, la membrana basal y la capa de podocitos<sup>3</sup>.



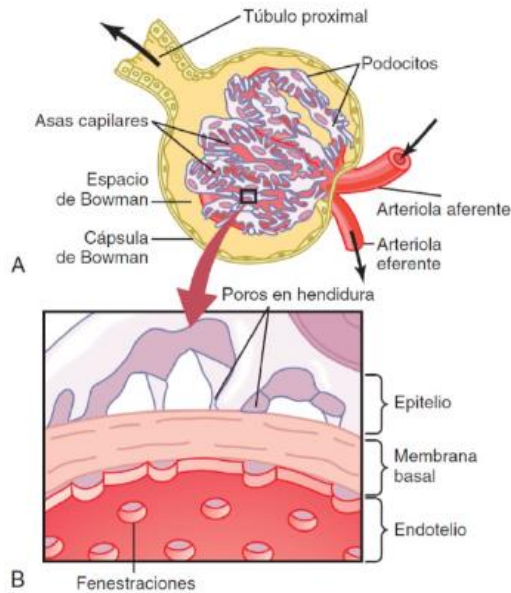


Figura 3. Ultraestructura básica de los capilares glomerulares. B. Sección transversal de la membrana capilar glomerular, sus principales componentes: el endotelio capilar, la membrana basal y el epitelio (podocitos)<sup>1</sup>.

2. Cuando el ultrafiltrado sale de la cápsula de Bowman y fluye a lo largo de los túbulos, su composición se va modificando por los cambios en la concentración de solutos como el sodio, glucosa y aminoácidos, acompañados por la reabsorción de agua procedente de los túbulos (Figura 4). En el túbulo proximal se reabsorbe alrededor de 2/3 del sodio, agua, bicarbonato, glucosa y aminoácidos filtrados, así como pequeñas cantidades de albumina que podrían haber escapado del filtrado inicial en el glomérulo y que pueden aparecer en la orina. En términos generales, la reabsorción tubular es mayor que la secreción tubular dentro del proceso de formación de la orina. La mayoría de las sustancias que deben ser depuradas se reabsorben poco y por lo tanto se excretan en grandes cantidades, como por ejemplo la urea y la creatinina. Algunas sustancias extrañas, como fármacos, también tienen tasas de excreción elevadas.

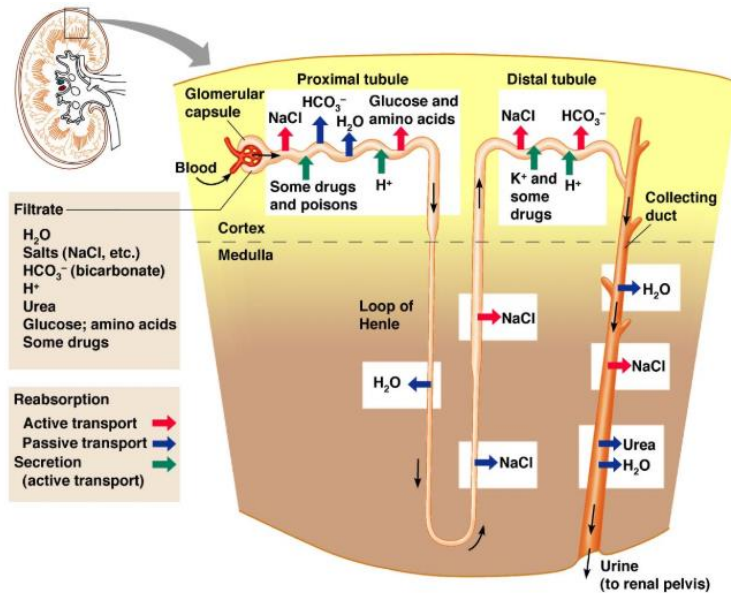


Figura 4. Formación de la orina a lo largo de la nefrona.

3. En el asa de Henle se inician los procesos de concentración o dilución de la orina mediante la reabsorción de en torno a un 25% de los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> filtrados, y un 15% de agua, enriqueciendo en solutos el intersticio medular y llevando una concentración pobre en solutos a los túbulos distales. La salida preferente de sodio en relación al agua, determina una hipertonicidad en el intersticio renal, indispensable para concentrar o diluir la orina y por tanto mantener el balance hídrico del organismo<sup>3</sup>. Está compuesta por tres segmentos: una porción fina descendente, una porción fina ascendente y una porción gruesa ascendente. La porción fina está compuesta por un epitelio plano, en cambio la porción gruesa ascendente está revestida por epitelio cúbico.

4. En los túbulos distales se continúa diluyendo el fluido luminal mediante estimulación hormonal de la reabsorción de NaCl y sales de Ca<sup>2+</sup>. El túbulo distal es una porción de la nefrona que comienza de forma abrupta

donde aumenta el grosor de la porción delgada del asa de Henle. La pared del túbulo está compuesta por un epitelio de células cubicas y en la superficie luminal se pueden observar microvellosidades cortas. En la superficie basal se pueden observar invaginaciones y plegamientos, donde se alojan múltiples mitocondrias. Su función principal se basa en la difusión pasiva del agua y activa de iones  $\text{Na}^+$ . Además, también es el responsable de la regulación de los iones potasio, sodio y calcio.

5. Los túbulos colectores llevan a término los últimos ajustes en la composición de la orina mediante la reabsorción de agua estimulada por la hormona antidiurética, la reabsorción de urea y el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ , estimulado por la aldosterona<sup>3</sup>. El epitelio que forma la pared de los túbulos colestores está compuesto por células cúbicas.

## 2. PROCESOS DE REABSORCIÓN EN EL TÚBULO PROXIMAL

### 2.1 Características morfológicas del túbulo proximal

El túbulo proximal es el sitio principal de reabsorción de proteínas, vitaminas y aminoácidos<sup>4,5</sup>. El túbulo proximal es el segmento más largo de la nefrona, ocupando la mayor parte de la corteza. Se originan en el polo urinario de los glomérulos y consiste en largos segmentos cilíndricos de trayectoria enrollada que desembocan en el asa de Henle. Por su interior circula el filtrado glomerular que irá madurando a lo largo de su recorrido hasta convertirse en orina. A lo largo del túbulo proximal encontramos diferencias morfológicas: la parte inicial cortical contorneada formando la *pars convoluta*, que es una continuación del epitelio de la capsula de Bowman, y una *pars recta* que sigue de manera rectilínea adentrándose hacia zonas más internas en las proyecciones medulares. Cuando se estudia mediante técnicas microscópicas, se pueden observar diferencias regionales que permiten identificar tres segmentos distintos. El segmento denominado S1 ocupa las porciones iniciales de la porción contorneada, se inicia en el glomérulo y engloba 2/3 partes del túbulo proximal contorneado. El segmento S2 se forma por la transformación gradual del segmento anterior y ocupa el último tercio del túbulo contorneado y parte de la porción inicial de la parte recta del túbulo. Finalmente, el segmento S3 abarca el resto de la porción recta. Cada uno de estos segmentos está constituido por diferentes tipos celulares con características morfológicas propias.

El epitelio del túbulo proximal está compuesto por células cuboidales altamente polarizadas. La polarización y la distribución apical-basolateral de estas células, es esencial para el correcto funcionamiento del túbulo, presentando una membrana apical con microvellosidades que constituyen el "*brush border*" o ribete en cepillo muy desarrollado que incrementa la

superficie de contacto con la luz del túbulo, proporcionando una superficie extensa para el transporte de iones y otras sustancias.

Las células del túbulo proximal presentan abundantes mitocondrias debido a la elevada tasa metabólica que experimenta esta región de la nefrona que facilita su participación en procesos de transporte activo; además, poseen un sistema vacuolar altamente desarrollado, compuesto por vesículas endocíticas y lisosomas que promueven la endocitosis y la degradación de moléculas del ultrafiltrado. Las células del túbulo proximal reposan sobre una membrana basal que le sirve de apoyo, y poseen un citoesqueleto organizado y muy especializado, que les permite interactuar con la membrana plasmática y las proteínas de adhesión<sup>1</sup>.

## 2.2 Reabsorción de electrolitos en el túbulo proximal

En el túbulo proximal se reabsorben aproximadamente dos terceras partes de agua, cloruro, sodio, así como todo el bicarbonato, azúcares, aminoácidos y péptidos filtrados. Esta reabsorción es posible gracias a las características celulares destacadas anteriormente.

Para que una sustancia se reabsorba, primero debe de ser transportada a través de las membranas del epitelio tubular hasta el líquido intersticial renal y luego, a través de la membrana capilar peritubular hasta la sangre. Los solutos pueden ser transportados mediante la vía transcelular (a través de las membranas celulares) por difusión pasiva o transporte activo, o mediante la vía paracelular (a través de los espacios que existen entre las uniones celulares) por difusión (Figura 5)<sup>1</sup>.

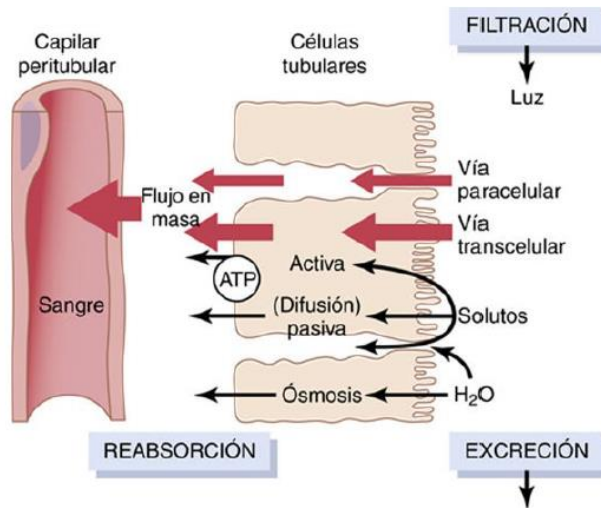


Figura 5. Vías de reabsorción de solutos a través de las células del túbulo proximal<sup>1</sup>

### 2.2.1 Reabsorción de sodio

La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa transporta sodio desde el espacio intracelular hacia el intersticio peritubular, intercambiándolo por potasio, a través de un proceso de transporte activo<sup>6</sup>. Teniendo en cuenta que la membrana celular es muy permeable al potasio y que el gradiente de concentración es favorable hacia el espacio extracelular, este catión tiende a abandonar el compartimento intracelular generando una carga negativa en el interior de la célula. El movimiento de potasio crea así, un doble gradiente (químico y eléctrico) para el sodio, entre la luz tubular y el compartimento intracelular que permite la entrada de este catión por el borde en cepillo, a través de sistemas de cotransporte o de contratransporte (Figura 6). En el sistema de cotransporte, el sodio, acompañado por glucosa u otros monosacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, fosfato, iones de cloro, etc., pasa desde la luz tubular al compartimento intracelular.

En el sistema de contratransporte, la entrada de sodio al interior de la célula se acompaña de la salida de hidrogeniones desde la célula a la luz del túbulo. Este transporte está mediado por el intercambiador de sodio-hidrogeno (NHE) que se encuentra en la membrana luminal. La salida de hidrogeniones hace que la concentración de  $\text{HCO}_3$  disminuya, al reaccionar ambos iones, dando lugar a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica<sup>1</sup>.

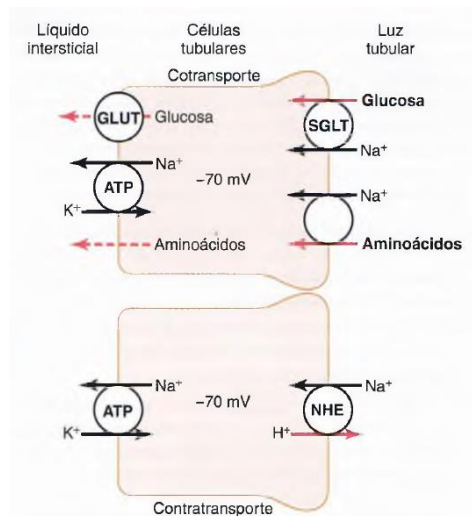


Figura 6. Mecanismos de transporte activo secundario. La célula superior muestra el cotransporte de glucosa, junto a los iones de sodio. La célula inferior muestra el cotransporte de iones hidrogeno, siguiendo el gradiente eléctrico establecido por la bomba sodio-potasio<sup>1</sup>

## 2.2.2 Reabsorción de calcio

Por otra parte, la mayor parte de la reabsorción de calcio tiene lugar a través de la ruta paracelular, donde el calcio es disuelto en agua y transportado con el líquido reabsorbido cuando circula entre las células. Solo el 20% de la reabsorción de calcio se produce a través de la ruta transcelular

en dos etapas diferenciadas (Figura 7). En primer lugar, el calcio se difunde desde la luz tubular a la célula a través de un gradiente electroquímico, debido a la diferencia de concentración de calcio entre la luz tubular y el citoplasma celular. En segundo lugar, el calcio sale de la célula a través de la membrana basolateral por una bomba de calcio-ATPasa y por el contrartransportador de sodio-calcio<sup>1</sup>.

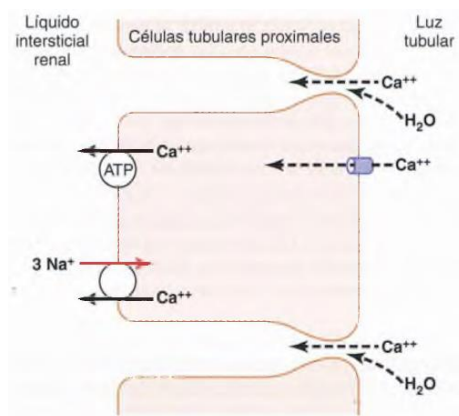


Figura 7. Mecanismos de reabsorción de calcio por las rutas paracelular en las células proximales<sup>1</sup>

### 2.2.3 Reabsorción del agua

El agua se reabsorbe por un gradiente osmótico, siguiendo a los solutos cuando son reabsorbidos. Puede atravesar las células, a través de canales específicos para el agua (aquaporinas), o bien a través del espacio paracelular. Cuando se reabsorbe por la vía paracelular, ocasiona un arrastre llevando consigo solutos como calcio, cloruro, sodio, potasio y magnesio.



### 2.3 Reabsorción de proteínas en el túbulo proximal

La reabsorción de proteínas por las células tubulares proximales ocurre principalmente a través de la formación de un complejo macromolecular. Este complejo está formado por los receptores multiligandos megalina-cubilina, la  $H^+$ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa, o bomba de protones), la isoforma 3 del intercambiador sodio-protón (NHE3) y el antiportador CLC-5 (Figura 8)<sup>4,7,8</sup>.

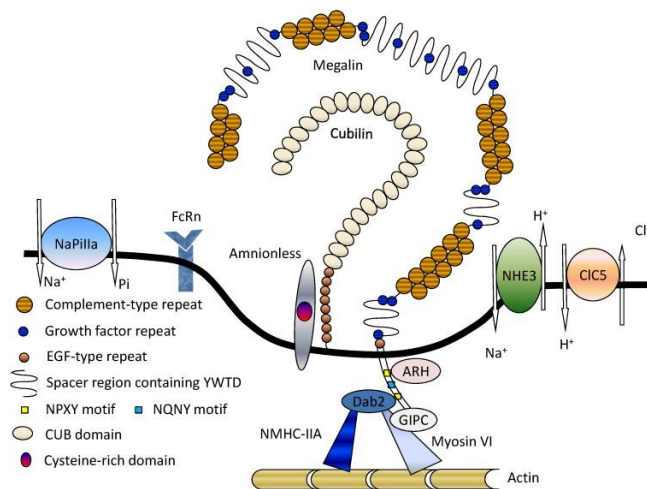


Figura 8. Representación del complejo macromolecular<sup>8</sup>

Los receptores megalina/cubilina se expresan abundantemente en las células del túbulo proximal, aunque también en otros tipos celulares tales como las células endometriales, células tiroideas y paratiroides, entre otros<sup>4,9</sup>. Se han identificado una gran cantidad de ligandos, tanto para megalina como para cubilina; de los cuales, algunos son específicos para uno de los receptores y otros son comunes. Los ligandos de unión al receptor megalina incluyen proteínas de unión a vitaminas, enzimas e inhibidores de enzimas, hormonas, toxinas, lipoproteínas, albúmina, hemoglobina, mioglobina, entre otros. En el caso del receptor cubilina, algunos ligandos son

comunes al receptor megalina (proteínas de unión a vitamina D, albúmina, hemoglobina, mioglobina), pero también presenta algunos exclusivos como es la transferrina o la apolipoproteína AI<sup>4</sup>.

La unión del ligando al complejo provoca que ambos se internalicen mediante vesículas revestidas de clatrina. Tras la internalización, las vesículas revestidas de clatrina se despojan rápidamente de su revestimiento y se fusionan con los endosomas tempranos, que son vesículas localizadas en la periferia de la célula. Los endosomas tempranos son un compartimento de clasificación desde el cual las moléculas absorbidas por endocitosis son recicladas a la membrana plasmática o bien transportadas al lisosoma para ser degradadas. Una característica importante de los endosomas tempranos es que mantienen un pH interno ácido entre 6-6.2). La acidificación endosomal se logra mediante el transporte, impulsado por ATP, de H<sup>+</sup> citosólicos a través de la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (V-ATPasa, o bomba de protones) donde CLC-5 funciona como un intercambiador Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> endosomal que facilita la acidificación, actuando a contracorriente con una estequiometría 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup> para mantener la electroneutralidad<sup>10-13</sup> (Figura 9).

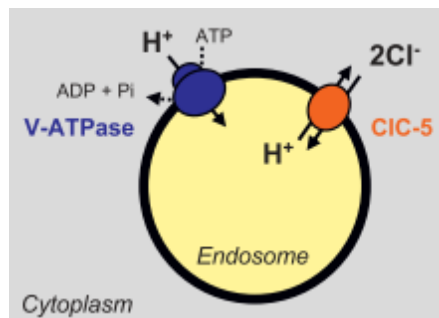


Figura 9. Proceso de acidificación endosomal. Modificado de<sup>14</sup>

La progresión a lo largo de la vía endocítica depende de esta acidificación del interior de los endosomas, donde el pH ácido provoca que la

mayoría de los ligandos se disocian de sus receptores. Tras este desacoplamiento, los receptores y sus ligandos pueden transportarse a destinos intracelulares diferentes. El destino principal de las proteínas de membrana captadas por endocitosis es el reciclaje, por tanto, muchos receptores vuelven a la membrana plasmática tras dissociarse de sus ligandos. El reciclaje de estos receptores supone la continua internalización de sus ligandos que son transferidos a los lisosomas donde se hidrolizan. Los aminoácidos resultantes retornan a la circulación a través de la membrana contraluminal<sup>15</sup> (Figura 10).

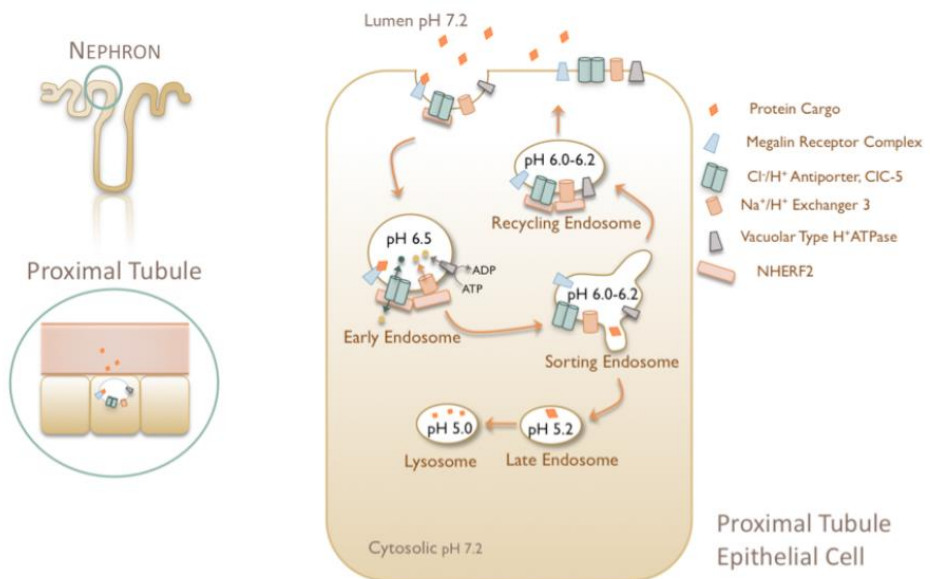


Figura 10. Representación esquemática del proceso de endocitosis en las células del túbulo proximal. Modificado de<sup>16</sup>.

El sistema endocítico de las células del túbulo proximal está sujeto a una pesada carga y una caída en la eficiencia del sistema debida a mutaciones inactivadoras de CLC-5<sup>17</sup>, o defectos en los receptores megalina-cubulina<sup>4</sup> o en

la maquinaria de endocitosis y reciclaje, las proteínas de bajo peso molecular (PBPM) se encuentran presentes en la orina, entre otras sustancias.

### 3. EL CANAL DE CLORO CLC-5

#### 3.1 La familia de Canales de Cloro (CLC)

Los canales de cloro se expresan en la membrana plasmática de la mayoría de células eucariotas y procariotas, participando en múltiples funciones fisiológicas, como por ejemplo, en la regulación del volumen celular, el transporte transepitelial y en la estabilización del potencial de membrana en el músculo<sup>18</sup>. Entre otras funciones, los canales de cloro puede unirse a proteínas y modificar su función<sup>19</sup>. La familia de canales de cloro (CLC) engloba tanto a canales selectivos de iones cloruro, así como a los antiportadores de cloruro-protón<sup>20</sup>.

El primer canal de cloruro dependiente de voltaje que se identificó molecularmente fue CLC-0, un canal abundantemente expresado en la especie *Torpedo marmorata*<sup>18</sup>. Tras la identificación del CLC-0, se descubrieron genes CLC en muchos otros organismos, incluidos bacterias, levaduras, plantas, peces y mamíferos<sup>21-23</sup>.

Las proteínas CLC humanas se dividen en tres subfamilias, basadas en la homología de secuencia y la modalidad de transporte de iones<sup>20</sup> (Figura 11):

- La primera subfamilia consta de los canales de iones cloruro y engloba a CLC-1, CLC-2, CLC-Ka y CLC-Kb. Estos canales de iones están localizados en la membrana plasmática donde están principalmente involucrados en el mantenimiento del potencial de membrana y en la homeostasis de iones<sup>20</sup>.
  
- La segunda (CLC-3, CLC-4 y CLC-5) y tercera (CLC-6 y CLC-7) subfamilias de CLC están formadas por transportadores cloruro-protón, también conocidos como antiportadores. Se expresan predominantemente en las membranas intracelulares del compartimento celular endosoma-lisosoma,

donde están involucrados en diversos aspectos de la endocitosis y degradación de proteínas. La importancia fisiológica de los canales iónicos y los antiportadores CLC se basa en su relación con diferentes enfermedades humanas<sup>20</sup>. En la Tabla 1 podemos observar sus diferentes localizaciones y funciones, así como su asociación con determinadas patologías.

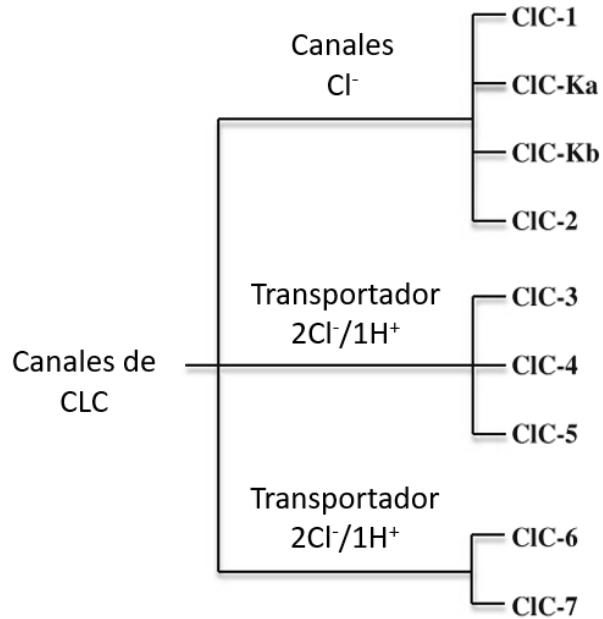


Figura 11. Familia de canales de iones cloruro. Modificado de<sup>20</sup>.

Tabla 1. Localización y papel fisiológico de las proteínas CLC de mamíferos y sus patologías asociadas. Modificado de<sup>20</sup>.

Proteína	Localización subcelular	Tejido	Patología	Función
<b>CLC-1</b>	Membrana plasmática	Músculo esquelético	Miotonia	Media la relajación muscular después de la contracción
<b>CLC-2</b>	Membrana plasmática	Ubicuo	Epilepsia	Homeostasis iónica
<b>CLC-3</b>	Endosoma tardío	Cerebro	-	Acidificación vesículas neuronales
<b>CLC-4</b>	Endosoma temprano	Ubicuo	-	Acidificación del endosoma
<b>CLC-5</b>	Endosoma temprano	Túbulo proximal	Enfermedad Dent	Reabsorción de Proteínas en el riñón
<b>CLC-6</b>	Endosoma tardío	Cerebro	Lipofuscinosis ceroide neuronal	Degradación
<b>CLC-7</b>	Lisosoma membrana plasmática osteoclastos	Tejido óseo y cerebro	Osteopetrosis	Degradación y resorción ósea
<b>CLC-Ka</b>	Membrana plasmática	Asa de Henle y oído interno	-	Homeostasis
<b>CLC-Kb</b>	Membrana plasmática	Asa de Henle y oído interno	Síndrome de Bartter	Reabsorción de sodio

### 3.2 Canal de cloro 5 (CLC-5)

CLC-5 es uno de los transportadores de CLC más estudiados en mamíferos y representa el tema principal de esta tesis. La proteína CLC-5 compuesta de 746 aminoácidos y con una masa molecular de 83 kDa. Se expresa principalmente en riñón e intestino<sup>24,25</sup>. En el riñón, se encuentra principalmente en el túbulo proximal y en las células  $\alpha$  intercaladas del túbulo colector<sup>25-27</sup>. Además, también se puede localizar, en menores proporciones, en otros segmentos de la nefrona, tales como en la rama ascendente gruesa y en extremidades descendientes delgadas del asa de Henle<sup>28</sup>. En las células del túbulo proximal, CLC-5 se localiza en la membrana de los endosomas, co-localizando con la V-ATPasa<sup>25,27-29</sup>. También podemos detectar transitoriamente en la membrana plasmática una pequeña fracción de CLC-5<sup>27</sup>, debido al proceso de reciclaje que experimentan los componentes del macrocompuesto endocítico, que retornan a la membrana plasmática para la captura de nuevos ligandos. En ratas, el mRNA de CLC-5, además de encontrarse en riñón e intestino, también se localiza en tiroides, y en menor medida, en cerebro, hígado, pulmón y testículos<sup>24,25,30</sup>.

CLC-5 presenta diversas e importantes funciones<sup>31,32</sup>, incluyendo el control de la excitabilidad de la membrana, el transporte transepitelial y la acidificación de los endosomas y vesículas sinápticas<sup>10</sup>. Mediante estudios de electrofisiología, se ha observado que mutaciones en el gen *CLCN5* provocan la pérdida o reducción significativa de la actividad transportadora de iones  $\text{Cl}^-$ <sup>26,33</sup>.

El análisis de la estructura tridimensional cristalográfica de proteínas CLC homólogas en bacterias, sugiere que estas proteínas de membrana funcionan como homodímeros, donde cada subunidad constituye una vía independiente de translocación que es capaz de conducir aniones y, en el caso



de los antiportadores, protones<sup>34,35</sup>. El área de contacto en la interfaz del dímero transmembrana es extensa y ocupa una superficie de 2300 Å. Cada subunidad contiene 18 dominios de membrana de longitudes variables, denominadas de la letra A a la R, que se encuentran dispuestos en una arquitectura antiparalela dentro de la membrana. La parte N-terminal está formada por las hélices comprendidas entre la hélices B - I y la parte C-terminal está formada por las hélices J - Q. Ambos grupos de hélices se encuentran orientadas en direcciones opuestas dentro de la membrana (Figura 12)<sup>34</sup>.

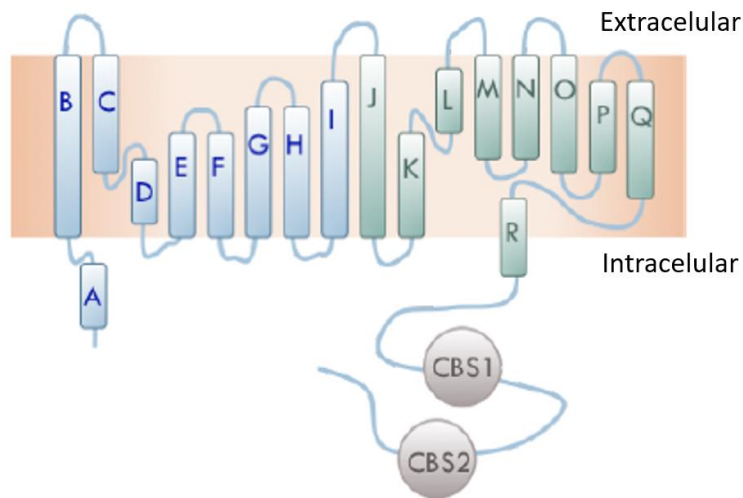


Figura 12. Representación esquemática de la proteína CLC-5. Modificado de <sup>34</sup>

La arquitectura antiparalela permite que residuos altamente conservados de cuatro hélices alfa (hélices D, F, N y R) del extremo N-terminal tengan un punto de unión entre ellas. Esto crea un ambiente electrostático favorable para que se produzca la translocación de iones<sup>34</sup>. El dominio citoplásmico está conectado al dominio transmembrana a través de la hélice R. Las hélices A, B, G, H, I, P y Q forman la interfaz entre ambos monómeros. A diferencia de las proteínas CLC procariontas, todas las proteínas CLC de los mamíferos contiene un gran extremo carboxilo terminal citoplásmico que se

compone de dos dominios de cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS), denominados CBS1 y CBS2, una secuencia rica en prolina, denominada PY, y un posible motivo de unión a proteínas PDZ (dominio estructural que contiene muchas proteínas). Se cree que pueden estar implicados en la regulación del transporte de CLC-5 y en su localización celular<sup>16,36-38</sup>.

### 3.3 Interacciones proteicas con CLC-5

CLC-5 participa en varias interacciones proteína-proteína y todas ellas mediada por su extremo carboxilo terminal. Estas interacciones son esenciales para la regulación de algunos procesos importantes, tales como la estabilización del complejo endocítico a la membrana plasmática o la mediación de la gemación de los endosomas a través de la despolimerización del citoesqueleto de actina, un proceso crítico para la endocitosis de albúmina<sup>39,40</sup>. Estas proteínas incluyen: la proteína despolimerizante de actina (cofilina), la ubiquitin-ligasa Nedd 4-2, el factor-2 regulador de intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (NHERF2) y la proteína motora miembro de la familia de kinesina 3B (KIF3B)<sup>39-42</sup>.

- El extremo carboxilo terminal de CLC-5 interactúa directamente con la proteína despolimerizante de actina<sup>42</sup>, denominada cofilina, a través de un sitio de unión no identificado, que no se encuentra en los subdominios CBS1 y CBS2. Hryciw y colaboradores<sup>42</sup>, proponen que la interacción entre ambas proteínas, en la membrana plasmática de las células del túbulo proximal, desempeña un papel crucial en la despolimerización del citoesqueleto de actina para mediar la gemación de endosomas nacientes, un proceso crítico para la endocitosis de albúmina. La inhibición de la interacción de la proteína cofilina- CLC-5 redujo drásticamente la absorción de albúmina en un modelo de túbulo proximal<sup>42</sup>.

- La región de enlace entre los subdominios CBS1 y CBS2 de CLC-5 contiene un motivo PY que facilita la interacción con la ubiquitin-ligasa WW-HECT Nedd 4-2. Hryciw y colaboradores<sup>40</sup>, demostraron la interacción proteína-proteína entre el extremo C-terminal de CLC-5 y las ubiquitin-ligasas Nedd4/Nedd4-2, indicando que Nedd4-2 es un regulador fisiológico de la absorción constitutiva de albúmina en las células de túbulo proximal. También demostraron que la presencia albúmina aumenta la cantidad de CLC-5 total, así como la fracción de CLC-5 en la membrana plasmática. Nedd4-2 ubiquitina los antiportadores CLC-5 reclutados en la membrana plasmática de las células del túbulo proximal en respuesta a concentraciones fisiológicas de albúmina, proporcionando un mecanismo para encaminar a CLC-5 y a las proteínas que componen el complejo endocítico, hacia la vía endocítica<sup>40</sup>. El silenciamiento de Nedd4-2 mediante siRNAs en células de túbulo proximal provocó una reducción significativa de la cantidad de albúmina internalizada. Demostrando, por lo tanto, que la ubiquitinación de CLC-5 mediada por Nedd4-2 facilitaría la reabsorción de proteínas *in vitro*<sup>40</sup>.

- CLC-5 también interactúa con la proteína NHERF2, que contiene dos dominios PDZ, a través de un sitio de unión desconocido. Los dominios PDZ se unen a la ezrina, que se une a la membrana plasmática periférica. La interacción entre CLC-5 y NHERF2 media el reclutamiento del antiportador CLC-5 en la superficie celular en respuesta a albúmina y permite el anclaje del complejo endocítico a la membrana plasmática. Dos eventos que son críticos para la reabsorción de albúmina. Hryciw y colaboradores<sup>39</sup>, demostraron que el silenciamiento de la proteína NHERF2 en las células epiteliales de riñón producía una reducción de la expresión de CLC-5 en la superficie celular, y en consecuencia una reducción en la internalización de albúmina<sup>39</sup>.

- Mediante el sistema de doble híbrido, se identificó una nueva interacción de CLC-5 con KIF3B, una proteína motora que facilita la

translocación anterógrada de los orgánulos membranosos<sup>41</sup>. El sitio que facilita la interacción se desconoce. Reed y colaboradores<sup>43</sup>, establecieron que la interacción entre ambas proteínas es importante para la expresión de CLC-5 en la membrana plasmática, el transporte microvesicular en la vía endocítica y para regular la reabsorción de albúmina<sup>41</sup>.

Aunque el mecanismo de acción del antiportador CLC-5 no se ha dilucidado completamente, cada vez es más evidente que CLC-5 juega un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del complejo endocítico a lo largo de la vía endocítica. Mutaciones en el gen *CLCN5* conducen a la enfermedad de dent.

#### 4. ENFERMEDAD DE DENT

La enfermedad de Dent es tubulopatía primaria considerada como una enfermedad rara. Las enfermedades raras se pueden definir como aquellas que presentan una prevalencia inferior a 5 casos por cada 10.000 personas. Pese a esta baja prevalencia, se estima que existen entre 5.000 y 8.000 enfermedades raras distintas, de manera que sólo en la población europea, el número de afectados sería de alrededor de 30 millones de personas<sup>44,45</sup>. La mayoría de estas enfermedades aparecen durante la edad pediátrica y el 80% de los casos son de origen genético<sup>45</sup>. Por otro lado, las tubulopatías o enfermedades del túbulo renal se definen como alteraciones clínicas en las hay una disfunción tubular específica, con escasa o nula alteración inicial del filtrado glomerular. Esta definición es válida únicamente en estadios precoces, ya que en el curso evolutivo de una tubulopatía también puede producirse una patología glomerular secundaria<sup>46</sup>. Las tubulopatías primarias son aquellas que se producen por un trastorno genético y se manifiestan en la infancia; en cambio, las secundarias, se manifiestan a cualquier edad como consecuencia de la administración de fármacos o tóxicos.

##### 4.1 Descripción general y origen de la enfermedad de Dent

La enfermedad de Dent es un trastorno hereditario ligado al cromosoma X y consiste en una tubulopatía proximal renal caracterizada por proteinuria de bajo peso molecular (PBPM), pérdida masiva de calcio en la orina (hipercalciuria), calcificación de los túbulos renales (nefrocalcinosis) y/o desarrollo de cálculos renales (nefrolitiasis), raquitismo u osteomalacia e insuficiencia renal progresiva. Algunos pacientes también presentan otros trastornos tubulares como hiperaminoaciduria, hiperfosfaturia, glucosuria, hiperuricosuria o incremento en la eliminación urinaria de potasio.

Este trastorno fue descrito por primera vez en 1964 por los doctores Dent y Friedman<sup>47</sup>, al presentar el caso de dos niños con raquitismo e hipercalciuria, pero sin defectos en la acidificación de la orina. Además de la pérdida de calcio por la orina, los pacientes presentaban retraso en el crecimiento y un defecto en la reabsorción tubular de fosfato y aminoácidos<sup>47</sup>. Scriver y colaboradores<sup>48</sup>, ese mismo año, también describieron un paciente con raquitismo hiperfosfatémico, glucosuria e hiperglicinuria con etiología renal. En los años 80, se describió el caso de un varón con raquitismo hipercalciúrico que mostraba proteinuria tubular<sup>49</sup>. Suzuki y colaboradores<sup>50</sup>, en 1985, describieron por primera vez en Japón el caso de cinco niños varones, dos de ellos hermanos, asintomáticos, sin retraso en el crecimiento pero que presentaban proteinuria diagnosticada a partir de un estudio rutinario. Ese mismo año, Murakami y colaboradores<sup>51</sup> publicaron cinco nuevos casos, asintomáticos, con proteinuria de bajo peso molecular. Por este motivo, a esta enfermedad, en un primer momento se la describió como *proteinuria asintomática*<sup>50,52</sup>.

El grupo del *University College Hospital* de Londres, en 1990, sugiere por primera vez el nombre de la *enfermedad de Dent*, al estudiar a los familiares, no relacionados, de ocho pacientes afectados de proteinuria tubular, hipercalciuria, raquitismo y/o nefrocalcinosis<sup>53</sup>. De los 53 familiares estudiados, 23 individuos presentaban defectos tubulares renales y 8 de ellos habían desarrollado insuficiencia renal crónica. En 1994, Wrong y colaboradores<sup>54</sup>, ampliaron la serie inicial y determinaron que, genéticamente, ésta enfermedad estaba ligada al cromosoma X.

Frymoyer y colaboradores<sup>55</sup>, en el año 1991, publicaron un trabajo donde se estudió a una familia estadounidense de 162 miembros, pertenecientes a seis generaciones diferentes, en donde se encontraron nueve varones afectados. Estos pacientes, presentaban nefrolitiasis cálcica,

proteinuria, nefrocalcinosis y evolución hacia insuficiencia renal. Las biopsias renales revelaron atrofia tubular, fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis<sup>55</sup>. Las mujeres portadoras eran sintomáticas con solo anomalías bioquímicas leves detectables en la orina<sup>56</sup>. Con estas manifestaciones clínicas denominaron a esta “nueva” enfermedad renal hereditaria con el nombre de nefrolitiasis recesiva ligada al cromosoma X con fallo renal. Por otra parte, en 1992, un grupo italiano describió una nueva variedad de raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X<sup>57</sup>. Igarashi y colaboradores<sup>58</sup> sugirieron que los trastornos descritos anteriormente en EEUU y en Japón podían ser los mismos que la enfermedad de Dent.

Durante la década de los años noventa, se identificó el gen causante de la nefrolitiasis recesiva ligada al cromosoma X, mediante un estudio de ligamiento. El gen se localiza en la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma X (Xp11.22) y fue posteriormente clonado y caracterizado en 1995<sup>59</sup>. Posteriormente, Loyd y colaboradores<sup>60</sup> descubrieron que los cuatro síndromes eran causados por mutaciones en el gen *CLCN5*, y desde entonces se les catalogan como enfermedad de Dent. En la actualidad, el 60% de los casos se atribuyen a mutaciones en este gen.

Hoopes y colaboradores<sup>61</sup> determinaron la existencia de un nuevo gen causante de la enfermedad de Dent, al descubrir 13 pacientes con un fenotipo clínico similar a la enfermedad de Dent pero sin mutaciones en el gen *CLCN5*. Cinco pacientes presentaban mutaciones en el gen *OCRL1*, anteriormente atribuido al síndrome oculocerebrorenal ligado al cromosoma X de Lowe. El gen *OCRL1* codifica una fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-5-fosfatasa (*OCRL1*) que se localiza en el aparato de Golgi y en los endosomas tempranos, y desempeña un papel en el tráfico y la endocitosis celular<sup>62-65</sup>. El 15% de los casos de la enfermedad de Dent están causados por el gen *OCRL1*. Esta variante se conoce como Dent de tipo 2. ). En el 25% restante de los casos, se

desconoce la causa genética del trastorno. La falta de mutaciones en los genes anteriormente descritos, en pacientes con manifestaciones clínicas de la enfermedad de Dent, sugieren que existen otros genes asociados con la enfermedad<sup>61</sup>. Los genes candidatos *CLCN4*, *CFL1*, *SLC9A6* y *TMEM27* que codifican para CLC-4, Cofilina-1, NHE6 y colectrina se han estudiado y excluido como causa de la enfermedad de Dent<sup>66-68</sup>. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del Dent 1.

## 4.2 Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Dent se manifiesta a través de diferentes síntomas clínicos, como la PBPM, hipercalciuria, nefrocalcinosis, nefrolitiasis e insuficiencia renal progresiva, entre otros<sup>54,55,69,70</sup> (Tabla 3). Es frecuente que entre el 30 y 80% de los varones afectados progresen a enfermedad renal crónica (ERC) durante la tercera y quinta década de la vida<sup>71</sup>. En la enfermedad de Dent también pueden presentarse otras manifestaciones clínicas indicativas de disfunción del túbulo proximal, como aminoaciduria, glucosuria, hiperfosfaturia, caliuresis, y uricosuria, dando lugar a un síndrome de Fanconi parcial<sup>14,54</sup>. El síndrome de Fanconi es una disfunción tubular renal generalizada en la que está alterada la reabsorción proximal de aminoácidos, glucosa, fosfato, urato y bicarbonato. Por tanto, la eliminación urinaria de estos solutos es elevada y se acompaña de un incremento en la excreción de agua, sodio, potasio, calcio, magnesio, carnitina, gliceraldehído, lisozima y proteínas PBPM<sup>72</sup>.

Existe una minoría de pacientes con enfermedad de Dent que pueden desarrollar raquitismo u osteomalacia<sup>54,73</sup>. Estos pacientes pueden presentar dolor óseo y dificultad para caminar debido al raquitismo. Mediante estudios de densitometría ósea se puede observar una reducción en la densidad mineral<sup>74,75</sup>. Estas manifestaciones clínicas se dan sólo en hombres y pueden



presentarse desde la primera infancia<sup>68,76,77</sup>. La mayoría de los pacientes Dent, presentan síntomas clínicos sutiles, de manera que un alto porcentaje de pacientes permanecen asintomáticos durante la infancia. Es un hecho, que en los casos infantiles se presenten otros síntomas antes de que ocurra la disfunción renal. En el caso de las mujeres portadoras, las manifestaciones clínicas de la patología pueden ocurrir ocasionalmente. Entre el 50 y 70% de mujeres portadoras presentan un fenotipo leve, probablemente debido a la inactivación aleatoria de uno de los dos cromosomas. Entre los síntomas más frecuentes destacan PBPM e hipercalciuria, mientras que las manifestaciones más graves de nefrolitiasis e insuficiencia renal solo se han detectado en tan solo 10 y 1 mujer, respectivamente<sup>54,78,79</sup>.

*Tabla 2. Presentación clínica de los pacientes con enfermedad de Dent. Cohorte de 109 pacientes masculinos con mutaciones CLCN5 (Dent-1) y 9 pacientes con mutación del gen OCRL (Dent-2). Modificado<sup>80</sup>.*

	<b>% Pacientes Dent 1 (CLCN5)</b>	<b>% Pacientes Dent 2 (OCRL1)</b>
<b>PBPM</b>	100	100
<b>Hipercalciuria</b>	92	100
<b>Nefrolitiasis</b>	32	17
<b>Nefrocalcinosis</b>	42	11
<b>Aminoaciduria</b>	50	80
<b>Hipouricemia renal</b>	63	100
<b>Hipocalemia</b>	44	25
<b>Glicosuria</b>	45	0
<b>Acidosis tubular</b>	17	25
<b>Síndrome Fanconi incompleto</b>	73	55
<b>Síndrome Fanconi completo</b>	11	11
<b>Raquitismo</b>	19	14
<b>Retraso en el desarrollo</b>	30	67

#### 4.2.1 Proteinuria de bajo peso molecular (PBPM)

En el caso de los varones afectados, la característica más común de esta patología es la pérdida masiva de PBPM, entre las que se incluyen de  $\beta$ 2-microglobulina,  $\alpha$ 1-microglobulina, o proteína de unión al retinol, producida por un deterioro en el proceso de reabsorción del túbulo proximal del riñón<sup>54</sup>. Esta característica se manifiesta en etapas muy tempranas, tal y como se demostró en Japón mediante el uso de pruebas de detección de PBPM en niños de edad escolar<sup>81</sup>. Estas proteínas de bajo peso molecular (< 40 KDa) pueden aparecer en la orina de los pacientes en niveles mayores a 100 o hasta 1000 veces la tasa de excreción normal<sup>54,71,37</sup>, pero también se han descrito dos casos de pacientes que no presentan PBPM<sup>83,84</sup>. En cambio, las mujeres portadoras pueden presentar una excreción normal o ligeramente elevada de proteínas de bajo peso molecular<sup>56</sup>. En los niños afectados, la cantidad de proteína total en orina puede ser de hasta 1g por día, mientras que en adultos, el rango se encuentra entre 0.5 y 2 g por día<sup>79</sup>. De las proteínas que se encuentran en la orina, el 50-70% corresponden a proteínas de bajo peso molecular, tanto en niños como adultos. Esta PBPM en la orina de los pacientes con la enfermedad de Dent es indicativa del defecto en la reabsorción de las proteínas filtradas<sup>54</sup>.

#### 4.2.2 Hiper calciuria

La hiper calciuria es una manifestación prevalente en la enfermedad de Dent, estando presente en cerca del 90% de los pacientes<sup>54,66,69,71,80,85</sup>. La excreción urinaria de calcio en niños afectados es de 9-14 mg/kg/día, mientras que en pacientes adolescentes y adultos el rango varía entre 4 y 6 mg/kg/día.

En pacientes, se observan niveles séricos de la hormona paratiroidea (PTH) bajos, mientras que los niveles de 1,25 (OH) 2-vitamina D3 son altos<sup>77</sup>.

#### 4.2.3 Nefrocalcinosis

Otra manifestación que se desarrolla prácticamente en todos los pacientes Dent es la nefrocalcinosis, que aparece normalmente a partir de la adolescencia, y en ocasiones es detectable en la infancia. La fisiopatología de la nefrocalcinosis no está clara, y su presencia y gravedad no se correlaciona consistentemente con la insuficiencia renal<sup>80</sup>. Respecto a la nefrolitiasis, existe variabilidad inter e intra familiar, que se asume que contribuye a la disminución de la función renal<sup>71</sup>. La nefrolitiasis parece ser el resultado de la asociación de la hipercalciuria y la alteración en el manejo de cristales de fosfato de calcio y de cristales de oxalato a nivel del túbulo colector<sup>69,86-90</sup>.

Esta enfermedad conduce a una disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (TFG) y eventualmente a la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD, de las siglas en inglés *End Stage Renal Disease*). Entre la tercera y quinta década de vida, el 30 y 80% de los varones afectados desarrollarán enfermedad renal crónica (ERC)<sup>71</sup>, no obstante, en algunos casos puede no aparecer hasta los 60 años o incluso más tarde<sup>54</sup>.

#### 4.3 Hallazgos histológicos en biopsias de pacientes

Las biopsias practicadas en pacientes muestran distintos resultados, que van desde la normalidad hasta mostrar glomerulosclerosis, atrofia tubular o cicatrización intersticial sin inflamación<sup>51,65,77,91-93</sup>. Se han descrito varios casos en que las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Dent eran proteinuria asintomática y hallazgos histológicos de glomeruloesclerosis focal

o global segmentaria<sup>82,94</sup>. El análisis genético del gen *CLCN5* en todos los casos demostró la presencia de mutaciones, por lo que Copelovith y colaboradores<sup>94</sup> sugirieron que, en pacientes con proteinuria asintomática, glomerulosclerosis focal idiopática y sin evidencia de enfermedad glomerular primaria, debe considerarse el diagnóstico de la enfermedad de Dent. La identificación de mutaciones en *CLCN5*, en pacientes con las manifestaciones clínicas mencionadas, puede ser crucial para permitir un diagnóstico preciso y temprano que evite los efectos adversos asociados con tratamientos innecesarios y potencialmente dañinos en estos pacientes<sup>93</sup>.

#### 4.4 Diagnóstico genético

En la actualidad, el diagnóstico definitivo se establece mediante la identificación de una mutación en uno de los dos genes asociados con la enfermedad, *CLCN5* y *OCRL*, mediante pruebas genéticas moleculares.

#### 4.5 Tratamiento

En la actualidad, no existe tratamiento para la enfermedad de Dent. Los objetivos principales del tratamiento son disminuir las manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad.

Los tratamientos actuales consisten en una adecuada ingesta hídrica para disminuir el riesgo de nefrolitiasis junto con la restitución de solutos que se pierden en exceso por la orina. Los diuréticos tiazídicos se pueden utilizar para reducir la excreción urinaria de calcio y, en consecuencia, disminuir el riesgo de litiasis en los pacientes<sup>95,96</sup>. Los diuréticos tiazídicos actúan sobre los receptores de tiazidas en la porción inicial del túbulo contorneado distal renal, mejorando la excreción renal de  $\text{Na}^+$  a través de la inhibición del

cotransportador  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ <sup>97</sup>. Sin embargo, la aparición de efectos secundarios es frecuente, tales como hipovolemia e hipocalcemia relacionados con la tubulopatía primaria<sup>95</sup>. Por ello, es necesaria una dosificación correcta y mantener una monitorización de los efectos secundarios. En el caso de hipofosfatemia, los pacientes deben recibir suplementos orales de fosfato.

Con respecto al raquitismo, en algunos pacientes se ha utilizado el aporte de vitamina D<sup>54</sup> y aunque en la actualidad se sigue utilizando, muchos médicos no son partidarios de su uso ya que puede agravar la hipercalcemia. Por lo tanto, el tratamiento con vitamina D debe de ser indicado en los casos con enfermedad ósea clínica. Sin embargo, no existe una correlación clara entre hipercalcemia/nefrocalcinosis e insuficiencia renal.

En el caso de la proteinuria, se han utilizado inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARA) para reducir la proteinuria y para prevenir o retrasar la pérdida de la función renal, sin embargo, su efectividad no ha sido clara<sup>98</sup>.

Cuando los pacientes con la enfermedad de Dent alcanzan la etapa terminal de la enfermedad renal, la terapia de reemplazo renal es necesaria. La hemodiálisis, la diálisis peritoneal y el trasplante renal son opciones apropiadas. Dado que las manifestaciones de la enfermedad de Dent se localizan en gran medida en el riñón, la nefrocalcinosis y nefrolitiasis no ocurrirán<sup>77</sup>.

## 4.6 Mutaciones patogénicas en el gen *CLCN5* causantes de la enfermedad de Dent de tipo 1

### 4.6.1 Gen *CLCN5*

El gen *CLCN5* humano está constituido por 13 exones, once de los cuales son codificantes (2 al 12) y dos (1a y 1b) usados de forma alternativa, pero permanecen sin traducir<sup>59,99</sup>. Posteriormente, Ludwig y colaboradores confirmaron la existencia de 4 exones adicionales (I-IV) en el extremo 5' del gen<sup>100</sup>.

El gen *CLCN5* se sitúa en el cromosoma Xp11.23/11.22 y tiene una longitud de 150 Kb. Este gran tamaño se debe a la presencia de un gran intrón que interrumpe los exones III y IV, y que ocupa 117 Kb<sup>100</sup>. Los estudios de expresión realizados indican la existencia de 4 tipos de RNAs mensajeros de *CLCN5* (mRNA tipo 1-4)<sup>100</sup>. Forino y colaboradores<sup>101</sup>, identificaron un quinto tipo (Tabla 3).

Tabla 3. Transcritos del gen *CLCN5*

Nombre	Referencia	Bp	Proteína
Transcrito <i>CLCN5_1</i>	NM_001127899	10108	816 aa
Transcrito <i>CLCN5_2</i>	NM_001127898	3046	816 aa
Transcrito <i>CLCN5_3</i>	NM_000084	3117	746 aa
Transcrito <i>CLCN5_4</i>	NM_001282163	2660	746 aa
Transcrito <i>CLCN5_5</i>	NM_001272102	449	64 aa

El transcrito principal que se detecta es el mRNA de tipo 3, que además de encontrarse en riñón puede localizarse, en niveles más bajos, en la corteza adrenal, la glándula suprarrenal, el músculo esquelético, el hígado, la placenta, el intestino, la próstata, las células gliales y también en leucocitos<sup>24,25</sup>. Este

mRNA codifica para una proteína de 746 aminoácidos (aa), denominada CLC-5.

#### 4.6.2 Mutaciones en el gen *CLCN5*

En la actualidad, se han identificado al menos 234 mutaciones en el gen *CLCN5*<sup>102</sup>. Las mutaciones descritas se distribuyen a lo largo del gen, e incluyen mutaciones sin sentido (nonsense) o de terminación (aproximadamente un 36%), de cambio de sentido (missense) (33%), inserciones (6%), deleciones (18%), mutaciones de *splicing*<sup>14,33,75,79,81,103-110</sup>. Aproximadamente la mitad de las mutaciones truncan la proteína y, como consecuencia, ocasionan una pérdida de la función. Más de un tercio de las mutaciones descritas provocan un cambio de sentido (missense), y muchas de ellas provocan la abolición o reducción de las corrientes de Cl<sup>-</sup>. Las consecuencias que producen las mutaciones se han obtenido a partir de ensayos realizados en un sistema de expresión heteróloga, como los ovocitos de *Xenopus laevis* o en la línea celular HEK-293<sup>33,60,103,108</sup>. Muchas de las mutaciones que producen un cambio de sentido afectan a residuos aminoacídicos que se localizan en la interfaz del dímero de CLC-5<sup>111</sup>. Existen variedad de estudios que han demostrado que las consecuencias funcionales y biológicas de las diferentes mutaciones en *CLCN5* son diversas, algunas ocasionan la retención en el retículo endoplasmático y la degradación de la proteína mutante, otras causan alteraciones en la localización intracelular de CLC-5. Además, también existe un grupo de mutaciones que altera la actividad eléctrica. Recientemente, se han descrito tres mutaciones que no presentan defectos a nivel de la acidificación endosomal<sup>108,112-114</sup>.

La mayoría de las mutaciones encontradas en *CLCN5* son únicas, por lo que resulta difícil establecer una correlación genotipo-fenotipo en la enfermedad de Dent. Para poder establecer esta relación es necesario

aumentar el conocimiento de las consecuencias a nivel intracelular atribuidas a cada mutación. Por otra parte, es probable que la variabilidad de manifestaciones de esta enfermedad se deba a factores ambientales no identificados y/o a la acción de genes modificadores desconocidos.

Como ya se comentó anteriormente, los estudios funcionales realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* o en líneas celulares permitieron agrupar las mutaciones en *CLCN5* en tres clases<sup>17,108,113-115</sup> (Figura 13):

- La clase 1 engloba mutaciones que alteran el procesamiento y plegamiento de la proteína induciendo su retención en el retículo endoplasmático y, consecuentemente, la degradación de la proteína mutante por los sistemas de control de calidad de la célula. Como resultado, las proteínas mutantes no se glicosilan adecuadamente y por tanto, no son funcionales.
- La clase 2 está formada por la agrupación de mutaciones que causan un retraso en el procesamiento de la proteína CLC-5 y una reducción de su estabilidad de la forma glicosilada madura. Como consecuencia, la expresión de CLC-5 en la superficie celular y las corrientes mediadas por la proteína mutante en la membrana plasmática se reducen. Sin embargo, la distribución de los mutantes en los endosomas tempranos es normal<sup>114,116</sup>.
- La clase 3, incluye aquellas mutaciones que afectan la actividad eléctrica pero no el tráfico de la proteína CLC-5 hacia la membrana plasmática y los endosomas tempranos<sup>17</sup>



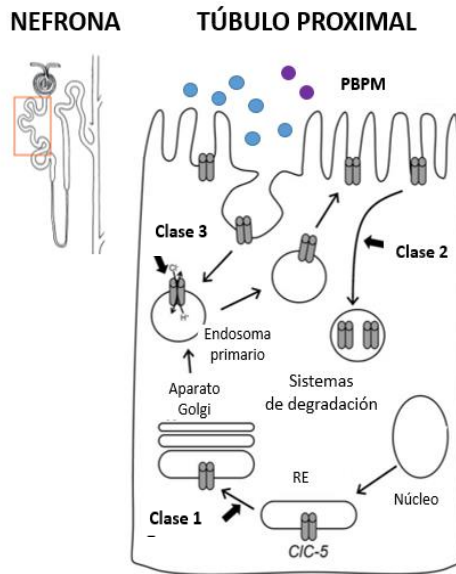


Figura 13. Mecanismos moleculares responsables de la función alterada en la enfermedad de Dent. Modificado de<sup>17</sup>.

Es de especial interés la mutación p.V523del<sup>68,104</sup>. Esta mutación ha sido descrita sólo en 4 pacientes, uno de ellos en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (HUVH), el cual presentó unas características clínicas muy acentuadas. Esta mutación consiste en una deleción de tres nucleótidos, por lo tanto, mantiene la pauta de lectura correcta. Estudios a nivel electrofisiológico en células HEK-293, demostraron que está mutación provocaba una pérdida de la capacidad electrogénica del CLC-5<sup>68</sup>.

## 4.7 Modelos de la enfermedad de Dent

### 4.7.1 Modelos celulares

Como se ha comentado en el punto anterior, los modelos celulares más empleados para el estudio de algunas de las mutaciones son las líneas celulares HEK-293 o Opossum Kidney<sup>33,42,60,103,108,114</sup>. Recientemente, también

se han utilizado líneas celulares epiteliales tubulares proximales inmortalizadas derivadas de pacientes Dent<sup>112</sup>. Para la caracterización electrofisiológica es frecuente el uso de ovocitos de *Xenopus laevis*.

#### 4.7.2 Modelos animales KO

En la última década se ha podido avanzar en el estudio de los mecanismos subyacentes a la patogénesis causada por la inactivación del antiportador CLC-5, gracias al desarrollo de varios modelos animales que han permitido estudiar del papel fisiológico e identificar de defectos asociados con la pérdida de CLC-5. Estos modelos animales reproducen algunas de las características que presentan los pacientes con enfermedad de Dent, tales como la PBPM, aminoaciduria, glucosuria, hiperfosfaturia y poliuria<sup>7,90,117,118</sup>. Se observa que en los diferentes modelos de ratón Knockout (KO) para CLC-5, difieren en algunas características genotípicas, tales como la hipercalciuria, nefrocalcinosis y el metabolismo de la vitamina D<sup>90,117</sup>.

##### 4.7.2.1 Reabsorción de proteínas en el túbulo proximal en un modelo KO

El estudio de los modelos de ratón mostró que la PBPM se debe a un defecto en la función que desempeñan los endosomas tempranos, comprometiendo al proceso de internalización y degradación de los ligandos. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el defecto en el proceso de endocitosis observado en pacientes y en los diferentes modelos animales KO para CLC-5 podría ser debido al deterioro de la acidificación, como resultado de la pérdida de permeabilidad al Cl<sup>-</sup> mediada por CLC-5<sup>119</sup>.

CLC-5 también parece tener un papel importante en la abundancia y en la localización correcta de algunas proteínas involucradas en el complejo endocítico, tales como megalina, cubilina y la V-ATPasa. Los niveles de megalina y cubilina se redujeron significativamente en extractos de riñón de ratones KO para CLC-5, en contraste con los niveles de mRNA que

permanecían conservados. Además, los receptores megalina y cubilina se encontraban ausentes en las membranas apicales de las células epiteliales del túbulo proximal, donde típicamente se localizan para capturar ligandos<sup>7</sup>, con la consiguiente pérdida de sus ligandos por la orina<sup>4,9,90</sup> (Tabla 4).

*Tabla 4. Fisiopatología de la enfermedad de Dent en un modelo KO para CLC-5. Modificado de<sup>14</sup>*

<b>CLC-5</b>	<b>Acidificación vesicular</b>	<b>Tráfico de los receptores</b>	<b>Endocitosis</b>	<b>Fenotipo Enfermedad de Dent</b>
<b>WT</b>	Normal	Normal	Normal	Ausente
<b>KO</b>	Defectuoso	Defectuoso	Defectuoso	Presente

En pacientes con enfermedad de Dent, se ha observado una disminución significativa de la abundancia de megalina en el túbulo proximal<sup>120</sup>. A pesar de la reducción de megalina y cubilina en los bordes del cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal, la ultraestructura celular del complejo endocítico en ratones KO CLC-5 permanecieron intactos<sup>7</sup>. Estas observaciones en el modelo KO para CLC-5 también reflejan aquellas observadas en los túbulos proximales de pacientes con enfermedad de Dent. Además, en biopsias de pacientes con la enfermedad de Dent se observa una deslocalización de la V-ATPasa, lo que conduciría a un defecto en el tráfico de proteínas<sup>92</sup>.

#### 4.7.2.2 Hiperfosfaturia en un modelo KO

Respecto a la pérdida urinaria excesiva de fosfato observada tanto en los ratones KO para CLC-5 como en pacientes de la enfermedad de Dent<sup>54,90,117</sup>, se cree que la responsable de la absorción de fosfato en el túbulo

proximal es la PTH, que es un péptido que regula el cotransportador de sodio-fosfato (NaPi-IIa). En condiciones no patológicas, las moléculas de PTH son filtradas a través del glomérulo y recuperadas mediante el proceso de endocitosis mediadas por el receptor megalina en las células del túbulo proximal<sup>121</sup>. Cuando existe una disrupción del proceso de endocitosis, las moléculas no se reabsorben, acumulándose en el segmento más distal del túbulo proximal, y por lo tanto, encontrándose presentes en la orina tanto de pacientes como en los modelos animales de ratón KO para CLC-5<sup>90,122</sup>. Este aumento de los niveles de PTH da lugar a un aumento de la estimulación de los receptores PTH apicales del segmento distal del túbulo proximal, lo que desencadena la internalización y la degradación de NaPi-IIa y, por lo tanto, incrementa la concentración de fosfato urinario. Los estudios realizados en ratones KO para CLC-5 apoyan esta hipótesis ya que el cotransportador NaPi-IIa se encuentra ausente del borde en cepillo de las células del túbulo proximal y se encuentra localizado de forma anormal en otros compartimentos intracelulares<sup>90</sup>. La alteración del proceso de endocitosis sería una consecuencia indirecta que podría explicar la hiperfosfaturia observada en pacientes y ratones KO para CLC-5<sup>90,122</sup>.

#### 4.7.2.3 Hipercalciuria en un modelo KO

La hipótesis de que la hipercalciuria en la enfermedad de Dent es intrínseca a los mecanismos mediados por el riñón está respaldada por la observación de que la hipercalciuria está ausente después del trasplante renal<sup>71</sup>. Por lo tanto, esto sugiere que CLC-5 puede participar en el transporte renal de calcio después de observar que la expresión de CLC-5 en la corteza renal está bajo la regulación de la PTH y que la expresión de CLC-5 renal está inversamente relacionada con la excreción urinaria de calcio<sup>90</sup>. En situaciones

no patológicas, las células del túbulo proximal convierten el precursor inactivo de vitamina D  $25(\text{OH})\text{-VitD3}$  en la hormona activa  $1,25(\text{OH})_2\text{-VitD3}$ <sup>123</sup>. La enzima responsable de esta reacción es la  $1\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial, cuya transcripción es activada por PTH<sup>123</sup>. Por otro lado, la vitamina D y su precursor se transforman en metabolitos inactivos por medio de la 24-hidroxilasa, cuya transcripción es activada por  $1,25(\text{OH})_2\text{-VitD3}$ <sup>123</sup>. El complejo de receptores megalina-cubilina media la reabsorción de la proteína de unión a vitamina D (DBP) (unido a su vez a la vitamina D) y la PTH que son filtradas por el glomérulo. Cuando existen pérdidas urinarias de estas hormonas (DBP y PTH), en los ratones KO para CLC-5 y en los pacientes con la enfermedad de Dent, podría dar lugar a efectos opuestos en las células del túbulo proximal. Estos efectos podrían resultar en niveles variables en suero de  $1,25(\text{OH})_2\text{-VitD3}$ , y la variabilidad existente podría explicar las diferencias encontradas entre los diferentes modelos de ratones KO y la variabilidad en la manifestación de hipercalciuria y nefrolitiasis observada en los pacientes con la enfermedad de Dent<sup>90,117,124</sup>. La pérdida urinaria de DBP, que transporta la mayor parte de vitamina D circulante en plasma, puede explicar la manifestación de defectos óseos<sup>125</sup>. Sin embargo, otros estudios han planteado la posibilidad de que CLC-5 pueda estar relacionado con la absorción de calcio gastrointestinal y que la hipercalciuria observada en la enfermedad de Dent puede representar un evento secundario<sup>71,79,90,125</sup>. Sin embargo los estudios experimentales no han demostrado un aumento en la absorción intestinal, y apuntan a una pérdida renal primaria de calcio y al aumento del recambio óseo, por medio de un mecanismo desconocido hasta la fecha<sup>87</sup>.

Se ha descrito que la proteína CLC-5 juega un papel importante en la regulación de la proteína TRPV6 y, a su vez, en la modulación de la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, la desregulación de TRPV6 causada por mutaciones en CLCN5 podría contribuir al desarrollo de hipercalciuria en la enfermedad de Dent<sup>126</sup>.

#### 4.7.2.4 Nefrolitiasis en un modelo KO

La nefrolitiasis podría contribuir a la pérdida de la función renal, como resultado de la combinación de distintos procesos, tales como la hipercalciuria y el manejo defectuoso de los cristales de fosfato y oxalato cálcico en el túbulo<sup>86-90</sup>. Otras características, como la aminoaciduria y la glucosuria, se deben probablemente a la falta de reciclaje de sus transportadores específicos a la membrana apical.

Todas estas consecuencias producidas por la inactivación de CLC-5 conducirían a la disfunción generalizada de las células del túbulo proximal<sup>119</sup>.

#### 4.7.2.5 Animales Knock-in (KI)

Además de los modelos animales KO para CLC-5 desarrollados, también se han generado modelos de ratón knock-in (KI) para el estudio de los mecanismos subyacentes causados por mutaciones en el gen *CLCN5*. En este tipo de modelos, en lugar de inactivar el gen *CLCN5* por completo, se introduce una mutación específica. En 2010, Jentsch y colaboradores<sup>127</sup> crearon un ratón KI portador de la mutación que cambia el ácido glutámico 211 por una alanina (E211A). El efecto que produce esta mutación, convierte a CLC-5 y a otros intercambiadores de CLC en simples conductores de Cl<sup>-</sup><sup>31,32,128-130</sup>. Se observó que la acidificación de los endosomas renales era dependiente de trifosfato de adenosina (ATP). En modelo KO para CLC-5 se observó una reducción de la acidificación endosomal. En cambio, los ratones KI presentaban una acidificación endosomal normal. Ambos modelos animales, tanto KO como KI, presentaban una endocitosis defectuosa y el fenotipo encontrado tanto en pacientes con la enfermedad de Dent como la

PBPM, hiperfosfaturia e hipercalciuria<sup>71,87,90</sup>. Además, se observó que algunas mutaciones de *CLCN5* en sistemas de expresión heterólogos y en células del túbulo proximal inmortalizadas de pacientes con enfermedad de Dent, no presentaban alteraciones en el pH endosómico<sup>112,114</sup>. En conjunto, estos resultados sugieren que la acumulación de cloruro endosómico durante el transporte de CLC-5 en las células del túbulo proximal puede ser crítica en la endocitosis, en lugar de la acidificación como se planteó inicialmente. También indican que el papel de CLC-5 en la fisiopatología de la enfermedad es más complejo de lo que se suponía anteriormente<sup>131</sup>.





# HIPÓTESIS



A pesar de que se han descrito algunos de los efectos funcionales causados por mutaciones en el gen *CLCN5*, aún se desconoce el efecto de las mismas sobre otras funciones propias de las células del túbulo proximal que de forma secundaria tendrían un impacto sobre la función tubular y, en consecuencia, en la función renal. Postulamos que el descubrimiento de redes génicas y procesos que ocurren como consecuencia de mutaciones en el gen *CLCN5* deberían proveer información relevante sobre los procesos fisiopatológicos de la enfermedad de Dent.



# OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido el establecimiento de modelos celulares representativos de la enfermedad de Dent para identificar y profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen a la progresión de la enfermedad. Eventualmente, estos procesos podrían hacerse extensivos a otros trastornos tubulares debidos a defectos en la endocitosis mediada por receptor.

Para ello, hemos elegido dos modelos de túbulo proximal humano (RPTEC/TERT y HK-2) para observar los cambios moleculares asociados con el silenciamiento (KO celular) y con las mutaciones p.V523del, p.E527D o p.I524K del gen *CLCN5* (KI celular). La utilización de líneas celulares establecidas, con el mismo fondo genético en todos los casos, permitirá observar los cambios exclusivamente asociados a la presencia/ausencia de *CLCN5* o a la presencia de distintas mutaciones.

Objetivos específicos:

- Producción de líneas celulares derivadas de túbulo proximal humano (RPTEC/TERT1 y HK-2) con silenciamiento del gen *CLCN5* (KO celular) y portadoras de las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K (KI celular) en el gen *CLCN5*.
- Caracterización de la expresión, localización subcelular, estado de glicosilación y vida media de la proteína CLC-5 en las líneas celulares descritas en el punto anterior.
- Caracterización funcional de las líneas celulares RPTEC/TERT1 y HK-2 transducidas con las formas *CLCN5* WT, p.V523del, p.E527D y p.I524K mediante el estudio de la capacidad endocítica.

- Caracterización molecular de las líneas celulares generadas el punto 1) mediante ensayos de expresión diferencial utilizando técnicas de Microarrays.
- Identificación y comparación del perfil de interacción proteica de CLC-5 WT, p.V523del, p.E527D y p.I524K. Identificación de proteínas que interactúan de forma común y específicamente.





# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). Las líneas celulares derivan del tejido epitelial renal y de células renales embrionarias.

**RPTEC / TERT1** (ATCC® CRL-4031): Esta línea celular se obtuvo por la transducción de los genes SV40 en células epiteliales del túbulo proximal renal. Son células adherentes que crecen en monocapa y muestran características morfológicas y funcionales de las células tubulares proximales bien polarizadas, incluidas la absorción de fosfato dependiente de sodio y la funcionalidad intacta del sistema de transporte de megalina/cubilina. Estas células forman “domes” característicos, mantienen una organización ultraestructural a través de las uniones estrechas, también presentan microvellosidades y cilios primarios.

**HK-2** (ATCC® CRL-2190). Estas células provienen de riñón humano y se obtuvieron a partir de la transducción de los genes E6/E7 del virus del papiloma humano (HPV16). Son células adherentes que crecen en monocapa y muestran características morfológicas de las células tubulares proximales bien diferenciadas.

**HEK293T** (ATCC® CRL-11268): Estas células son una variante de la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*). Corresponden a células embrionarias derivadas de riñón humano, transformadas para expresar de forma constitutiva el antígeno SV40. Las células HEK293T son muy fáciles de manejar y cultivar debido a su alta tasa de crecimiento y se usan comúnmente en las industrias de biología molecular y biotecnología para la expresión de proteínas y la producción de retrovirus recombinantes. Son células adherentes que crecen en monocapa.

## 1.2 Condiciones de cultivo

Las células fueron cultivadas y expandidas a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Las líneas celulares RPTEC/TERT1 y HK-2 se cultivaron en medio DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement (Gibco, # 31331-093) enriquecido con suero fetal bovino descomplementado (FBS) (mediante la incubación a 53°C durante 30 minutos), hormonas y factores de crecimiento (Tabla 5). Para el mantenimiento de las líneas transducidas con el vector de silenciamiento, el medio se suplementó con antibiótico de selección puromicina [8 µg / ml] en la línea RPTEC/TERT o [1 µg / ml] en el caso de la línea HK-2 (Invivogen # ant-pr-1). En ambas líneas, para el mantenimiento de los vectores re-introducidos, el medio fue suplementado con antibiótico de selección higromicina [400 µg / ml] (Invivogen # ant-hg-5)

Tabla 5. Medio de composición de las líneas celulares RPTEC/TERT1 y HK-2.

<b>Producto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
<b>Hepes</b>	20mM	Gibco (# 15630-080)
<b>Apotransferrina</b>	5 µg/ml	Sigma Aldrich (# T1428)
<b>Insulina humana</b>	5 µg/ml	Sigma Aldrich (# I9278)
<b>T3</b>	3 nM	Sigma Aldrich (# T5516)
<b>Dexametasona</b>	50 nM	Sigma Aldrich (# D8893)
<b>EGF</b>	10 ng/ml	Sigma Aldrich (# E4127)
<b>Selenio</b>	60 nM	Sigma Aldrich (# S9133)
<b>FBS</b>	2 % (v/v)	Gibco (# 10270)
<b>Antibiótico- antimicótico</b>	1% (v/v)	Gibco (# 15240-062)
<b>Plasmocin</b>	5 µg/ml	Invivogen (# ant-mpt)

En el caso de las células HEK293T, el medio utilizado fue el DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, Gibco™ # 42430082) suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino, Gibco™ # 10270098), piruvato de sodio al 1% [100 mM] (Gibco™ # 11360039), antibiótico / antimicótico al 1% (Gibco™ # 15240-062) y 5 µg/ml plasmocin (Invivogen # ant-mpp). Una vez preparados

los medios, se pasaron por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, # GSWP047S0) para su esterilización.

Dado que todas las líneas celulares en este estudio poseen propiedades adherentes y crecen en monocapa sobre un sustrato rígido, se utilizaron frascos (CytoOne® # CC7682-4875 y # CC7682-4825), placas (Nunc™ # 168381, # 150326) y placas de pocillos (Nunc™ # 140675, # 150628, # 142475) tratados para cultivo celular. Todas las líneas celulares fueron siempre manipuladas en una campana de flujo laminar.

### 1.3 Tripsinización

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%, se procedió al pase de las mismas. En cada pase, se recogió el medio de cultivo mediante aspiración y se lavaron con tampón PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). El proceso de tripsinización se llevó a cabo añadiendo Tripsina EDTA 0.05% (Biological Industries, # 03-053-1A) (volumen / área: 2 ml / 75  $\text{cm}^2$ ) y se incubó de 3-5 minutos a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad. Inmediatamente después, las células se separaron de la superficie de cultivo con golpes suaves y la tripsina se inactivó añadiendo medio de cultivo con FBS. A continuación, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 o 2 mL de medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron sembradas nuevamente a la densidad deseada en una nueva placa e incubadas en las condiciones adecuadas.

### 1.4 Recuento celular y siembra

Para sembrar la densidad adecuada para cada tipo celular, previamente se determinó la concentración celular. El método que se empleó para el recuento de células fue mediante la cámara *Neubauer*. En la parte central de ésta, se encuentra grabada una retícula cuadrangular que se utiliza para el conteo celular. Durante el procedimiento de contaje es posible que se produzca mortalidad celular, por ello es conveniente analizar la viabilidad celular. Para llevar a cabo la distinción entre las células vivas o muertas se utilizó azul de tripán (Sigma, # T6146) que es un colorante azoico que permea al interior de las células muertas. Para llevar a cabo el recuento, se cogió una alícuota de la suspensión celular y se preparó una dilución 1:5 en PBS 1x y azul de tripán. A continuación, se introdujo la solución preparada en la cámara de *Neubauer* y se contó el número de células viables en los diferentes campos y se realizó el cálculo siguiendo la siguiente fórmula.  $N^{\circ}$  de células/mL =  $n^{\circ}$  de células promedio de los 8 campos  $\times 5 \times 10^4$ .

### 1.5 Criopreservación

Las líneas celulares fueron criopreservadas en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 100%, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió y se congeló en presencia de dimetil sulfóxido (Sigma Aldrich, # D2650), sustancia crioprotectora, a una concentración del 10% en medio de cultivo. La suspensión celular debe congelarse lentamente para evitar la formación de cristales que podrían romper las membranas celulares. A continuación, se transfirió el criotubo (Nunc <sup>™</sup>, # 363401) a un recipiente especial de congelación (Mr. Frosty <sup>™</sup>, Thermo Scientific, <sup>™</sup> # 5100-0001) y se dejó O/N a  $-80^{\circ}\text{C}$  para permitir la congelación gradual de las células. Al día siguiente, los

criotubos se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido para su almacenamiento prolongado.

### 1.6 Descongelación celular

La descongelación celular consiste en un proceso rápido para evitar la pérdida de viabilidad celular. Las células fueron sacadas del tanque de nitrógeno y se descongelaron en un baño a 37°C. A continuación, se transfirió la suspensión celular del criotubo en un tubo con 4 mL de medio de cultivo precalentado y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con el volumen apropiado de medio de cultivo precalentado dependiendo de la superficie de cultivo posterior.

## 2. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES COMO MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE DENT

### 2.1 Silenciamiento del gen *CLCN5* en las líneas celulares RPTEC/TERT y HK-2

El silenciamiento génico o *knock down* es una técnica de biología molecular que permite disminuir la expresión de un gen en particular. Existen diferentes tipos de silenciamiento génico, sin embargo, uno de los más utilizados en la investigación es la vía de interferencia de ARN (ARNi). El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo biológico de regulación de la expresión génica, conservado evolutivamente y ampliamente distribuido en especies eucariotas, por el cual, se consigue silenciar genes, mediante secuencias cortas de doble cadena de RNA (dsRNA) que participan en la degradación o represión de la transcripción de una secuencia homóloga de RNA diana de forma específica. Este sistema, puede ser inducido tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante la aplicación directa de *small interfering RNAs* (siRNAs), microRNAs (miRNAs) sintéticos o por la expresión mediante vectores virales o no virales de short *hairpin RNAs* (shRNAs). El shRNA se integra de manera estable en el genoma de la célula, proporcionando una represión o degradación del gen de interés a largo plazo sin necesidad de transfectar las células varias veces. Por lo tanto, se ha convertido en una herramienta muy utilizada hoy en día en estudios genómicos.

### 2.2 shRNA

Los shRNAs contienen secuencias de RNA formadas por secuencias *sense* y *antisense* (específicas para cada gen) unidas por una secuencia central, que estructuralmente forma una estructura de horquilla (*hairpin*). Cuando se introduce el vector que contiene el shRNA en las células, este se transcribe de



forma endógena mediante la RNA polimerasa III. El RNA resultante, sigue el sistema de procesamiento endógeno de la célula, se procesa por la RNasa III citoplasmática DICER, produciéndose el siRNA correspondiente, que será el que degrade las moléculas de mRNA homólogas. El silenciamiento génico conduce a niveles más bajos de la proteína en cuestión, resultando en cambios fenotípicos. El silenciamiento génico puede evaluarse a nivel de mRNA utilizando métodos tales como RT-qPCR o a nivel de proteína mediante Western Blot.

En este estudio, las secuencias de shRNA utilizadas para *CLCN5*, pertenecen a la librería de RNAi contra genes humanos MISSION®shRNA Bacteria Glycerol stock (Sigma Aldrich) (Tabla 6) clonados en el vector pLKO.1-puro (Figura 15). Las secuencias tienen una repetición terminal LTR y una señal de Psi que permite el empaquetamiento lentiviral usando un sistema de tercera generación. Por lo tanto, las líneas celulares RPTEC/TERT1 y HK-2 se transdujeron con los shRNA por generación e infección de partículas lentivirales (Apartado 7.2) y se seleccionaron mediante la resistencia a puromicina conferida por el vector. Para el mantenimiento de las líneas transducidas con el vector de silenciamiento, el medio se suplementó con antibiótico de selección puromicina [8 µg / ml] en la línea RPTEC/TERT o [1 µg / ml] en el caso de la línea HK-2(Invivogen # ant-pr-1).

Tabla 6. Secuencias de shRNA utilizadas en el silenciamiento de *CLCN5*.

sRNA	ID	Secuencia
<b><i>CLCN5_shRNA1</i></b>	TRCN0000427059	CCGGCACCTATAGGTGGAGTATTATCTCGAG ATAATACTCCACCTATAGGTGTTTTTTG
<b><i>CLCN5_shRNA2</i></b>	TRCN0000414058	CCGGTTCATTCTGCTGGGCATATTTCTCGAGA AATATGCCAGCAGAATGAATTTTTTG
<b><i>CLCN5_shRNA3</i></b>	TRCN0000043903	CCGGGCCAAAGAAGAGTTTGCTCATCTCGAG ATGAGCAAACCTCTTCTTTGGCTTTTTG

<b>CLCN5_shRNA4</b>	TRCN0000043904	CCGGGCACCGAGAGATTACCAATAACTCGAG TTATTGGTAATCTCTCGGTGCTTTTTG
<b>CLCN5_shRNA5</b>	TRCN0000043905	CCGGGCTTTAACACTCATACTGAAACTCGAGT TTCAGTATGAGTGTTAAAGCTTTTTG

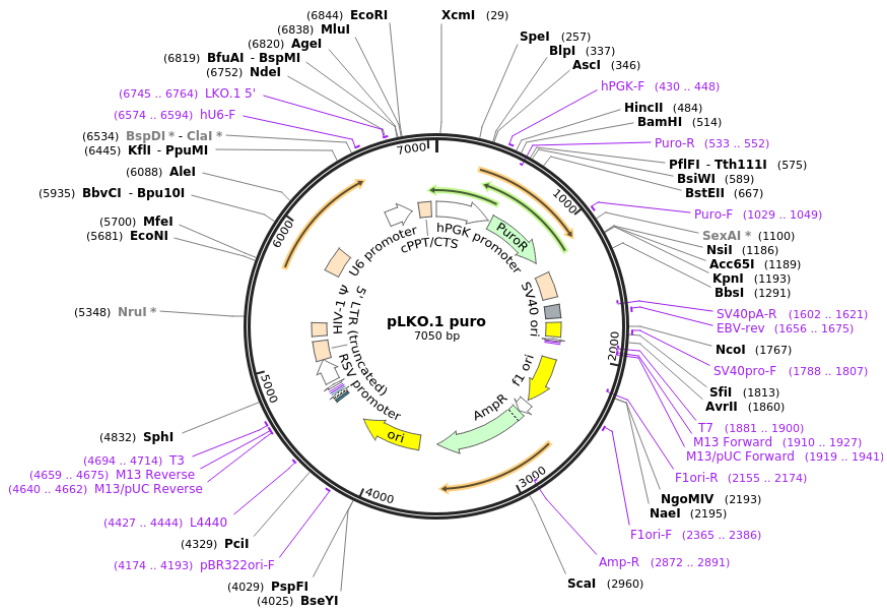


Figura 14. Mapa de secuencia completa del vector pLKO.1-puro que transporta los diferentes shRNA contra CLCN5.

### 3. GENERACIÓN DE MUTANTES

#### 3.1 Clonación del gen *CLCN5* mediante el sistema Gateway

El clonaje de DNA mediante ingeniería de DNA recombinante es la estrategia más habitual utilizada para alterar el patrón celular de la expresión génica. La estrategia que se ha seguido ha consistido en el clonaje mediante el sistema Gateway<sup>®</sup>. El sistema Gateway<sup>®</sup> desarrollado por Invitrogen, permite la introducción de insertos de un vector a otro, a partir de reacciones de recombinación basadas en el sistema del bacteriófago  $\lambda$ .

En la generación de nuestro modelo celular decidimos incluir un epítipo HA (de sus siglas en inglés, Influenza Hemagglutinin) en el extremo C-terminal. Esta estrategia es ampliamente utilizada en vectores de expresión, ya que no parece interferir con la bioactividad o la biodistribución de la proteína recombinante. La fusión del epítipo HA con la proteína facilita la detección, el aislamiento y la purificación de esta. Para ello se diseñaron unos cebadores específicos para *CLCN5* que contenían la secuencia del epítipo HA y una cola con la secuencia requerida para su posterior recombinación. Estos cebadores se utilizaron para amplificar el gen *CLCN5* a partir del vector pENTR223 (Plasmid ID, #HsCD00399904). La secuencia de los cebadores se detalla en la tabla 7.

*Tabla 7. Diseño de cebadores utilizados en el clonaje de CLCN5.*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
hCLC5-HA_Atth1_2_F	5'GACTTCTTGGACGAGCCAATC3'
hCLC5-HA_Atth1_2_R	5'CTAGTTGAAGAGAATGGAATCAGG3'

En la reacción de PCR se utilizó una polimerasa de alta fidelidad, con capacidad correctora Pfu Ultra (Agilent Technologies, # 600389) y las

condiciones fueron las siguientes: la reacción se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l, conteniendo 125 ng de cada uno de los cebadores, 200  $\mu$ M de dNTPs y 2.5 U de la enzima Pfu Ultra. Como molde se utilizaron 500 ng de DNA plasmídico (Plasmid ID, #HsCD00399904). El protocolo de amplificación constó de un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de 57°C, 2 minutos 30 segundos a 72°C, con un paso de elongación final de 10 minutos a 72°C.

### 3.2 Purificación del DNA

Los fragmentos de DNA resueltos electroforéticamente en un gel de agarosa se recuperaron y purificaron a partir del gel para utilizarse en futuras aplicaciones. En primer lugar, se separó electroforéticamente el producto de PCR generado en el punto anterior (3.2). Seguidamente, se recortó la banda a recuperar con una hoja de bisturí estéril, bajo luz ultravioleta. Para la purificación del DNA, a partir de la banda de agarosa recortada, se utilizó el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, # 28-9034-71) siguiendo el protocolo detallado por el fabricante.

### 3.3 Inserción cola de recombinación completa para su posterior recombinación

El cDNA que se obtuvo después de la purificación del gel de agarosa, se amplificó utilizando cebadores que contenían la cola de recombinación attb completa para así poder llevar a término su posterior recombinación (Ver tabla 8). Para la reacción de PCR se utilizaron las mismas condiciones que en la reacción de PCR previa (3.1). A continuación, se purificó el fragmento de DNA amplificado que contenía las colas attb1 y attb2 mediante la solución 30% PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub> del kit Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, #11789-020). En primer lugar, al producto de PCR obtenido se le

añadió 150 µL de Tampón TE. A continuación, se añadieron 100 µL del reactivo 30% PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub>. La mezcla generada se centrifugó durante 30 minutos a 16 000 xg a temperatura ambiente. El pellet resultante se resuspendió en 30 µL de Tampón TE y se determinó su concentración mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 Thermofisher™, # ND-2000).

*Tabla 8. Diseño de cebadores utilizados en el clonaje de CLCN5.*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
Attb_F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC T-3'
Attb_R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

### 3.4 Reacción de recombinación BP

El fragmento de DNA purificado se introdujo en un vector de entrada pDONR™ 221 (Invitrogen, #12536-017) que contiene los sitios de recombinación attb1 y attb2, a través de una reacción de recombinación mediada por la enzima BP Clonasa (reacción BP) que cataliza la recombinación entre los sitios attP1 y attP2 del vector de entrada (Figura 15). Para ello, se utilizó el kit Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, #11789-020). La reacción de recombinación se llevó a cabo en un volumen de 10 µL en una ratio molar inserto-vector de 1:1 mediante la incubación con la enzima BP Clonasa a 25°C durante 3.5 horas. Para terminar la reacción, se añadió 1 µL de Proteínasa K y se incubó a 37°C durante 10 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos generados en la reacción fueron transformados por choque térmico en células competentes XL-2 Blue Ultracompetent Cells, tal y como se detalla en el apartado 4.1, para su posterior análisis y manipulación.

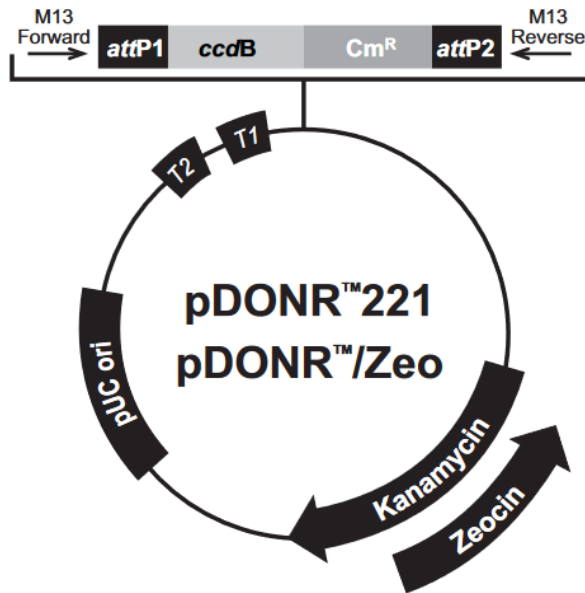


Figura 15. Mapa de secuencia del vector pDONOR™221.

### 3.5 Mutagénesis sitio-dirigida

Para introducir las mutaciones de estudio, se utilizó la técnica de mutagénesis sitio-dirigida, basada en la técnica de PCR y utilizada para generar cambios específicos e intencionales en la secuencia de un gen.

Para la delección, la introducción o inserción de uno o varios nucleótidos en un vector de DNA bicatenario (dsDNA) se utilizó el kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, #200521), siguiendo las indicaciones del fabricante. El sistema se basa en el uso de un vector plasmídico con un inserto a mutar y una pareja de cebadores, sentido y antisentido, totalmente complementarios entre sí. En el centro de la secuencia de los cebadores (ver diseño de cebadores) se introduce un cambio de nucleótido(s) a incorporar en el plásmido mutante. De esta forma, los cebadores, al hibridar con su secuencia complementaria en el exón, dejan un

desapareamiento de una o más bases en su centro, que corresponden al sitio de mutación. Posteriormente se generan varias copias del plásmido mutado, mediante rondas consecutivas de extensión con la DNA polimerasa de alta afinidad *Pfu Ultra (HF)*. Finalmente, con el fin de eliminar las moléculas de DNA molde (no mutado), el producto de la mutagénesis es tratado con la enzima *DpnI*, la cual degrada específicamente DNA hemimetilado.

Las reacciones de mutagénesis se realizaron en un volumen final de 50 µl, conteniendo 125 ng de cada uno de los cebadores, un mix de dNTPs y 2.5 U de *PfuUltra (HF)*. Como molde se utilizaron 50 ng de DNA plasmídico. El protocolo de amplificación constó de 18 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron digeridos con 2 µL de la enzima *DpnI* en un bloque térmico a 37 °C durante 1 hora. Seguidamente, se utilizaron 2 µl de la reacción de mutagénesis para transformar células ultracompetentes *E. coli XL1 Blue* (véase 4.1 Transformación en bacterias competentes). Cada uno de los clones obtenidos fue secuenciado bidireccionalmente para confirmar la secuencia mutante esperada (Ver 3.6 Diseño de cebadores).

### 3.6 Diseño de cebadores

A lo largo de este trabajo, se diseñaron varios cebadores. Todos los pares de cebadores fueron complementarios a la región del DNA molde deseada para mutar, sin embargo, llevaban cambios de nucleótidos en su región central. El diseño de los cebadores de mutagénesis se llevó a cabo mediante la aplicación informática *QuikChange Primer Design* (Agilent Technologies) (Tabla 8). Las características que se tuvieron en cuenta fueron las siguientes; tamaño entre 25 y 45 bases,  $T_m$  mayor o igual a 78°C, la base mutada localizada en el centro del cebador, contenido mínimo en GC del 40% y que, tanto en 5' como en 3', debía localizarse una G o una C

### 3.6.1 Mutaciones sinónimas o de rescate en el gen *CLCN5*

Se creó un mutante de "rescate" como una estrategia para permitir que el gen de interés (*CLCN5*) pudiera reintroducirse en la célula y escapar del mecanismo de silenciamiento previamente incorporado. La generación del mutante de "rescate" consistió en 6 mutaciones sinónimas sobre la secuencia reconocida por el shRNA. En el caso de la línea celular RPTEC/TERT1, el shRNA 4, y en la línea celular HK-2, el shRNA 3 (Tabla 9). Las mutaciones sinónimas cambiaron la secuencia, pero no el aminoácido codificado, por lo que la estructura original de la proteína permaneció sin modificaciones (Figura 16).

RPTEC/TERT1								HK-2							
Wt	G	CAC	CGA	GAG	ATT	ACC	AAT	AAA	wt	GCC	AAA	GAA	GAG	TTT	GCT
Mut	G	CAT	AGG	GAA	ATC	ACA	AAC	AAA	Mut	GCT	AAG	GAG	GAA	TTC	GCC
CLCN5 wt	H	R	E	I	T	N	K	CLCN5 wt	A	K	E	E	F	A	
CLCN5 rescue	H	R	E	I	T	N	K	CLCN5 rescue	A	K	E	E	F	A	

Figura 16. Diseño del cebador para el mutante de "rescate" *CLCN5*. Par de cebadores diseñados (forward y reverse) para realizar 6 mutaciones sinónimas en la secuencia reconocida por shRNA 3 y shRNA 4. Los pares de bases cambiados se muestran en rojo.

Tabla 9. Diseño de cebadores para introducir las mutaciones sinónimas en el gen *CLCN5* a través de la técnica de mutagénesis de sitio dirigido.

Cebador	Secuencia
Rescate RPTEC/TERT1_F	5'ttaaggcccatgtgactctttgcttttgtttgtgattccctatgcctatcccggctcgcgagacttctctc-3'
Rescate RPTEC/TERT1_R	5'gagagaagtctcgagaccgggatagggcatagggaaatcacaacaaaagcaaagatcaacatgggccttaa-3'
Rescate HK-2_F	5'atcacatccattgccagggtcttatggcgcaattcctccttagctcaagaaaggggatccattgag-3'
Rescate	5'ctcaatggatacccttcttgaagctaaggaggaattcgcccataagaccctggcaatggatgat-3'



### 3.6.2 Mutaciones patogénicas en el gen *CLCN5*

Los vectores que contenían las mutaciones de rescate del shRNA se usaron como molde para introducir tres tipos diferentes de mutaciones en el gen *CLCN5* (p.V523del (c.1566-1568del), p.E527D (c.1581A>T) y p.I524K (c.1571T>A)) utilizando los cebadores de la tabla 10.

*Tabla 10. Diseño de cebadores para introducir las mutaciones patogénicas en el gen CLCN5 a través de la técnica de mutagénesis de sitio dirigido.*

Cebador	Secuencia
p.V523del_F	5'-cggatgactgtttctctgtcataatgtttgaactgactg-3'
p.V523del_R	5'-cagtcagttcaaacattatgacaagagaacagtcacccg-3'
p.E527D_F	5'-ctctgtgtgcataatgtttgatctgactggtggccttagaa-3'
p.E527D_R	5'-ttctaagccaccagtcagatcaaacattatgacaacaagag-3'
p.I524K_F	5'-gactgtttctctgtgtgcaaaatgtttgaactgactggtg-3'
p.I524K_R	5'-caccagtcagttcaaacatttgacaacaagagaacagtc-3'

### 3.6.3 Cebadores de secuenciación

Para confirmar la mutagénesis sitio-dirigida y verificar que no ocurrieron otras mutaciones no intencionales durante el proceso, se diseñaron cebadores de secuenciación a lo largo de la región CDS de *CLCN5*, así como sobre la secuencia completa del vector pLenti CMV Hygro DEST 117-1 (Tabla 11) Los cebadores se separaron entre 500-700 pb para asegurar la superposición de la secuencia.

Tabla 11. Cebadores diseñados para la secuenciación del vector pdonor 221 y pLenti CMV.

Cebador	Secuencia
<b>CLCN5_1</b>	TGCCGTATCTCTTGCAAGGT
<b>CLCN5_2</b>	GCTCAAAGAGATGCCATGGG
<b>CLCN5_3</b>	GTGGCAGCATTCACTCTACG
<b>CLCN5_4</b>	GCTGGCTTTAACTCATACTGA
<b>CLCN5_5</b>	TGTGATGAAACCCCGGAGAA
<b>CLCN5_6</b>	GGAATCAGGATCTTGGTTCGC
<b>CLCN5_7</b>	GGGATAGGCACCGAGAGATT
<b>CLCN5_8</b>	GCTTGGCTTCATTCTCCTG
<b>CLCN5_9</b>	CTGGCGTGGGAGTCTACAGT
<b>CLCN5_10</b>	GTATGGTGGCAATGGAGGAG

### 3.7 Reacción de recombinación LR para expresar las formas CLC-5 WT y mutadas en un vector destino pLenti CMV Hygro DEST 117-1

Una vez generadas las distintas mutaciones, los insertos se subclonaron en un vector destino pLenti CMV Hygro DEST 117-1 (Figura 17), (Addgene, #17454), a través de la reacción con la enzima LR Clonasa que reconoce los sitios attb1 y attb2 del vector de entrada pDONR™ 221 y los attbR1 y attR2 del vector destino pLenti CMV Hygro DEST, llevando a cabo la recombinación y formando el vector de expresión con el gen de interés. La reacción LR se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, con ratios molares del vector pDONR: PDEST de 1:1 mediante la incubación con la enzima BP Clonasa a 25°C durante 4.5 horas. Los productos generados en la reacción fueron introducidos mediante transformación por choque térmico en células competentes XL-2 Blue Ultracompetent Cells (Stratagene, #200150 de Agilent

technologies), tal y como se detalla en el apartado 4.1, para su posterior análisis y manipulación.

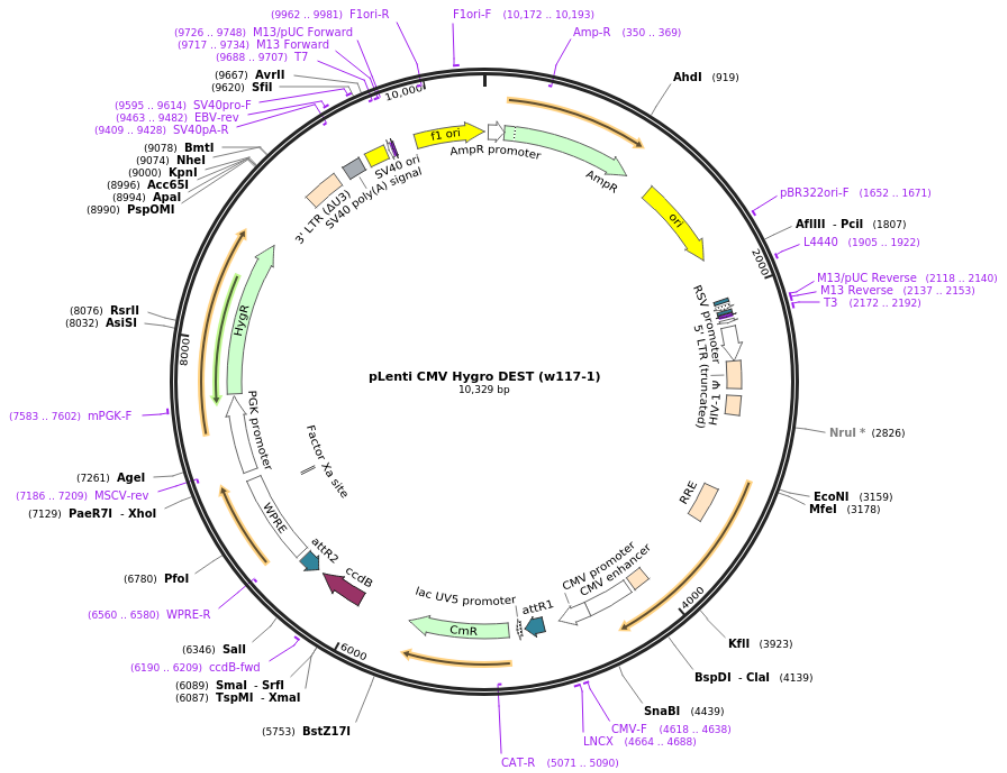


Figura 17. Mapa de secuencia completa del vector pLenti CMV Hygro DEST (w117-1).

## 4. MANIPULACIÓN BACTERIAS COMPETENTES

### 4.1 Transformación de bacterias competentes

La transformación es un proceso de transferencia horizontal de genes mediante la cual algunas bacterias incorporan material genético exógeno. Las bacterias que son capaces de incorporar DNA por transformación se denominan bacterias competentes. El método utilizado para la transformación se denomina choque térmico, utilizando las bacterias DH $\alpha$  (Thermofisher, # 18265017) o XL-2 Blue Ultracompetent Cells (Agilent technologies, # 200150), dependiendo de la eficiencia de transformación que se quiera conseguir. Tras la descongelación de las células competentes en hielo, se dispensaron 50  $\mu$ l de células en tubos eppendorf de 1.5mL enfriados previamente. A cada tubo se le añadieron de 2-4  $\mu$ l de DNA (dependiendo de la concentración o aplicación) y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se sumergieron en un baño a 42 °C durante 45 segundos y seguidamente se volvieron a introducir en hielo durante 2 minutos. A cada tubo se le añadieron 900  $\mu$ l de medio SOC (Invitrogen <sup>TM</sup> # 15544034) y se incubaron en agitación suave (180 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se tomaron alícuotas de 20 y 200  $\mu$ l y se sembraron en placas de agar en medio Luria-Bertani (LB) (Invitrogen, # 30391023) suplementado con ampicilina [50  $\mu$ g / ml] (Roche, # 10835242001) o kanamicina [100  $\mu$ g / ml] (Thermofisher, # 11815024) (dependiendo de la resistencia del vector). Las placas se incubaron O/N a 37°C para que crecieran las colonias. Todo este procedimiento se realizó cerca de un mechero Bunsen encendido.

## 4.2 Crecimiento de bacterias competentes

Las bacterias se reproducen a través de un proceso llamado fisión binaria que consiste en la división de una bacteria en dos células hijas genéticamente idénticas a la célula original. Además, las bacterias experimentan un crecimiento exponencial. Estas propiedades, además de la transformación, hacen que las bacterias sean el vehículo perfecto para la amplificación del material genético.

Para la amplificación de bacterias portadoras del DNA de interés, se utilizó un pre-cultivo líquido (5 ml) o cultivo (100 ml) de medio de crecimiento llamado Luria-Bertani (LB) (Invitrogen # 12795084). Si las bacterias provenían de colonias cultivadas en agar, solo se recogieron colonias redondas bien definidas y completamente aisladas para evitar la contaminación clonal. Las bacterias también podían provenir de glicerol previamente almacenado. De cualquier forma, ya sea una colonia o raspado, las bacterias se colocaron en un tubo de 30 ml previamente lleno con 5 ml de LB suplementado con ampicilina [50 µg / ml] o kanamicina [100 µg / ml]. Las bacterias fueron incubadas a 180 rpm y 37 ° C durante 8 h. Si se necesitaba una mayor amplificación del pre-cultivo, se traspasó un volumen de 400 µl del pre-cultivo en un volumen de 100ml de medio de cultivo LB líquido suplementado con ampicilina [50 µg / ml] o kanamicina [100 µg / ml] y se incubaron a 37 °C en agitación (180 rpm) durante 16 horas. La manipulación se realizó cerca de un mechero Bunsen encendido.

## 4.3 Identificación de colonias recombinantes

La identificación de colonias que habían incorporado el inserto deseado se llevó a cabo mediante una reacción convencional de PCR (ver apartado 5.2) con el DNA extraído a partir de la colonia de bacterias y los

cebadores correspondientes para el gen clonado (Ver apartado 3.5 Diseño de cebadores).

#### 4.4 Almacenamiento de bacterias competentes

Para el almacenamiento a largo plazo, las bacterias que contienen el DNA de interés se guardaron en glicerol. El glicerol estabiliza las bacterias congeladas, evitando daños a las membranas celulares y manteniendo las células vivas. Una vez que las bacterias habían crecido en un cultivo LB de 100 ml, se colocaron 800  $\mu$ l de cultivo bacteriano en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 200  $\mu$ l de glicerol al 50% (Sigma Aldrich, # G7757). Las bacterias y el glicerol se mezclaron completamente y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las reservas bacterianas se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C.

## 5. MANIPULACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

### 5.1 Aislamiento DNA plasmídico

Para el aislamiento y purificación del DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano de E.Coli se utilizaron dos kits diferentes basados en columnas, el kit Mini Spin Prep de plásmido Illustra™ (GE Healthcare # 28-9042-70) para realizar Minipreps de pre-cultivo bacteriano (5 ml), y el NucleoBond® PC100 - Kit de purificación de DNA plasmídico (Macherey-Nagel # 740573) se utilizó para realizar Midipreps de cultivo bacteriano (100 ml). En ambos casos, se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En primer lugar, el cultivo bacteriano generado se centrifugó a 6000 g a 4 ° C durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento bacteriano se lisó luego con una solución alcalina / SDS tratada con RNAsa para eliminar las moléculas de RNA. Tanto el DNA cromosómico como el plásmido se desnaturalizaron en estas condiciones alcalinas. Para la clarificación del lisado, se añadió acetato de potasio para formar un precipitado que contiene DNA cromosómico y otros compuestos celulares. El tampón de acetato de potasio también neutraliza el lisado. Después de equilibrar las columnas con el tampón apropiado, el DNA plasmídico se unió a la resina y finalmente se eluyó después de un lavado de la columna. A continuación, se precipitó con isopropanol (VWR # 20839.291), y se procedió al lavado con etanol al 75%. Finalmente, el DNA eluido se resuspendió en el volumen apropiado de agua estéril. El DNA plasmídico aislado se almacenó a -20 ° C para su posterior cuantificación y uso.

### 5.2 Extracción RNA total

Las extracciones de RNA total a partir de los cultivos de las líneas celulares se llevaron a cabo con el reactivo TRIzol® (ThermoFisher, 15596026), que consiste en una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina

que mantiene la integridad del RNA inhibiendo la actividad de las RNAsas, y ayuda a la disgregación de las células. Antes de la extracción, las células se lavaron con PBS y las células se resuspendieron en 1 ml de TRIZol<sup>®</sup> y se traspasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se introdujeron inmediatamente en hielo, y a continuación se realizó la extracción siguiendo el protocolo recomendado. Después se agregó el cloroformo y se agitó vigorosamente. Pasados 2-3 minutos, se centrifugaron las muestras a 12.000g durante 15 minutos a 4°C con el objetivo de obtener la separación física del RNA, una capa acuosa superior, contiene el ácido ribonucleico, y una capa orgánica inferior, que contiene DNA y proteínas. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el RNA añadiendo isopropanol y se centrifugaron las muestras a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron lavados con etanol 75% y se centrifugaron las muestras a 7.500g durante 5 minutos a 4°C para eliminar las impurezas. El RNA total se resuspendió en agua estéril libre de RNAsas.

### 5.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos

Para conocer la concentración y la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos en los procesos anteriores, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (ThermoFisher™, # ND-2000), que permite medir la cantidad de RNA y DNA presente en una muestra. La pureza de los ácidos nucleicos se determinó por la relación de absorbancia de 260 nm / 280 nm. El RNA se considera puro cuando la ratio es de 2 y para el DNA la ratio tiene que estar próxima a 1.8. Una relación inferior a estos valores indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.

Para comprobar la integridad del RNA o del DNA obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x



(40 mM Tris Base, 2 mM Ácido Acético, 0.2 mM EDTA). En cada pocillo se cargaron 2 µl de RNA o DNA, así como los marcadores de peso molecular 100pB y 1KB (Bioline). El resto del RNA obtenido fue almacenado a -80 °C hasta su utilización.

#### 5.4 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de DNA o RNA por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar un campo eléctrico para mover las moléculas cargadas negativamente a través de una matriz de agarosa. La agarosa es un polisacárido compuesto de moléculas helicoidales que forman canales y poros a través de los cuales pueden pasar las biomoléculas. Por lo tanto, este método separa los ácidos nucleicos por carga y tamaño.

Para comprobar la integridad del RNA o del DNA obtenido, se prepararon geles de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (40 mM Tris Base, 2 mM Ácido Acético, 0.2 mM EDTA). A la mezcla, se añadió 1,5 µl de SYBR®Safe (Invitrogen™, # S33102), se mezclaron y se vertieron en un molde con su correspondiente peine. SYBR®Safe es un tinte altamente sensible que se usa para teñir y visualizar ácidos nucleicos. Una vez solidificado, el gel fue sumergido en una cubeta de electroforesis con tampón TAE 1x, se retiró el peine y se cargaron muestras de ácido nucleico en pocillos, así como en el marcador de peso molecular HyperLadder I (Ecogen, # BIO-33026). Las muestras de DNA para su análisis fueron diluidas 1:5 en el tampón de carga Loading Buffer Blue (5x) (Ecogen, #BIO-37045). Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 50-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron visualizados mediante exposición a luz ultravioleta en el sistema *GelDoc* (BioRad *Laboratories*).

## 5.5 Transcripción inversa

La transcripción inversa o RT-PCR es una variación de la técnica clásica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite retrotranscribir una hebra de RNA a un DNA complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa. En este trabajo, se utilizó el kit High Capacity cDNA™ Reverse Transcription (Applied Biosystems, #4387406). El kit utiliza una mezcla de cebadores de ocho nucleótidos con secuencias generadas al azar para iniciar la síntesis de la hebra de DNA complementario. En cada reacción se utilizaron 2 µg de RNA total, diluido previamente en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, en un volumen final de 20µl utilizando la enzima Multiscribe. Las reacciones se llevaron cabo en el termociclador (G-STORM) y las condiciones seleccionadas fueron las siguientes: una incubación a 37°C durante 60 minutos y una incubación a 95 °C durante 5 minutos (inactivación de la retrotranscriptasa) y un ciclo final a 4°C. Una vez finalizada la RT-PCR, el cDNA se almacenó a -20 ° C para futuras aplicaciones.

## 5.6 PCR

La amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, se ha convertido en un procedimiento básico en el laboratorio de biología molecular. Cada reacción de amplificación se optimizó de forma individualizada para cada pareja de cebadores, teniendo en cuenta, la temperatura de alineamiento (T<sub>a</sub>) y el número de ciclos de la reacción. La elección de la polimerasa a utilizar, dependió de la aplicación concreta del producto de la PCR. Así pues, cuando nuestro objetivo fue la visualización del producto de la PCR en un gel de agarosa utilizó la Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline, # 21040), en cambio, en aquellos protocolos donde fue de vital importancia preservar la fidelidad de la amplificación, se optó por la utilización

de una polimerasa con actividad correctora o *proof-reading* como la Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent, # 600380).

La reacción de PCR para amplificar el cDNA se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de una dilución 1:10 del cDNA sintetizado, 10  $\text{NH}_4$  Reaction Buffer, 0.2  $\mu$ M de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 0.2 mM de deoxy-NTP, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1 unidad de BioTaq DNA Polymerase. Se realizó un paso inicial de desnaturalización de 94°C durante 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de 52°C, 30 segundos a 72°C, con un paso de elongación final de 5 minutos a 72°C. La cantidad de 5  $\mu$ L de producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% con SYBR (Invitrogen™, # S33102),

## 5.7 RT-qPCR

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) permite amplificar el cDNA obtenido en la transcripción inversa del RNA mensajero (mRNA) y poder cuantificar el producto generado en cada ciclo de amplificación. Esta cantidad de producto es directamente proporcional a la cantidad de cadenas de cDNA existentes en el inicio del proceso de la PCR. Para detectar en tiempo real los productos de PCR, se incluye en la reacción una sonda fluorescente que nos permite medir el aumento en la fluorescencia que se produce en los ciclos de la reacción a medida que se amplifica el DNA.

La PCR en tiempo real, consta de diferentes fases; una fase inicial o de latencia, donde la fluorescencia se mantiene a unos niveles no detectables por el termociclador, aunque existe una acumulación del producto de la PCR de forma exponencial. Una segunda fase o fase exponencial donde la cantidad del producto de PCR se duplica en cada ciclo. Sin embargo, a medida que

avanza la reacción se van consumiendo los diferentes componentes de la reacción hasta que llegan a ser limitantes. A partir de aquí, la reacción de PCR entra en la fase de saturación, donde finaliza la reacción. La acumulación de producto de la PCR generada a lo largo del proceso produce una señal de fluorescencia detectable. El ciclo donde tiene lugar este proceso es lo que se llama CT (*threshold cycle*). Este valor de CT depende de la cantidad de cDNA presente en el inicio de la reacción. En el presente trabajo experimental, se utilizaron cebadores específicos contra la secuencia diana del shRNA para analizar específicamente los niveles de *CLCN5* endógeno y cebadores específicos contra la secuencia del epítipo HA detectar específicamente el *CLCN5* re-introducido o exógeno (Tabla 12) y una sonda fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green. También se utilizaron sondas Taqman para la validación de los resultados obtenidos en el microarray (Ver punto 10.5). Estas sondas son oligonucleótidos que llevan unidas dos tipos de moléculas: un fluorocromo en el extremo 5' y un reductor de la emisión o *quencher* en el extremo 3'. Mientras la sonda se mantiene intacta, la proximidad del *quencher* absorbe la fluorescencia emitida por el fluorocromo. Cuando la Taq polimerasa llega al extremo 5' libera el fluorocromo gracias a su actividad exonucleasa distanciándose del *quencher*, momento en el que el fluorocromo emite fluorescencia. De esta manera el sistema se convierte en altamente específico, ya que el fluorocromo sólo emite fluorescencia cuando se amplifica la cadena de interés. En la tabla 13, se muestran las sondas Taqman.

Tabla 12. Lista de cebadores para RT-qPCR Sybr® Green

Gen	Forward	Reverse
<b>CLCN5</b> <i>endógeno</i>	GGGATAGGCACCGAGAGATT	GGTTAAACCAGAATCCCCCTGTG
<b>CLCN5</b> <i>exógeno</i>	GGTTACACACAACGGGCGAT	CGTAATCTGGAACATCGTA
<b>TBP</b>	CGGCTGTTAACTTCGCTTC	CAGACGCCAAGAAACAGTGA

Tabla 13. Lista de sondas TaqMan® para RT-qPCR utilizadas en la validación del microarray

Gen	Nombre	ID Taqman
<b>CLCN5</b>	Chloride channel 5	Hs00163986_m1
<b>TBP</b>	TATA-box binding protein	Hs00427620_m1
<b>STEAP1</b>	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Hs00185180_m1
<b>ZPLD1</b>	zona pellucida like domain containing 1	Hs00604192_m1
<b>PTPRD</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type D	Hs00369913_m1
<b>CDH1</b>	cadherin 1	Hs01023895_m1
<b>EMX2</b>	empty spiracles homeobox 2	Hs00244574_m1
<b>NR1H4</b>	nuclear receptor subfamily 1 group H member 4	Hs01026590_m1
<b>EHF</b>	ETS homologous factor	Hs00171917_m1

Cada reacción de PCR se llevó a cabo por triplicado, en placas de 384 pocillos, utilizando 0.5 µL de las sondas Taqman correspondiente, 5 µL de TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermofisher, #4369016) y 20 ng de cDNA en un volumen final de 10 µL. Para el uso de la sonda fluorescente SYBR® Green, las proporciones fueron las siguientes: 0.25 µL del primer forward y 0.25 µL del primer reverse, 5 µL de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermofisher, # 4367659) y 20 ng de cDNA en un volumen final de 10 µL. El instrumento utilizado para llevar a cabo la reacción y la detección de la fluorescencia fue el ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). Las condiciones de

PCR fueron las recomendadas por el fabricante (1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de minutos 10 minutos 95°C y 40 ciclos de 15 segundos 95°C, 1 minuto, 60°C).

La RT-qPCR permite tanto una cuantificación absoluta del número de copias de cada mRNA como una cuantificación relativa. El método utilizado para la cuantificación relativa fue el método comparativo CT, el cual determina la variación de la expresión en la muestra, en relación al calibrador, utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra estudio} - \Delta Ct \text{ calibrador}$ , siendo  $\Delta Ct = Ct \text{ gen estudio} - Ct \text{ control endógeno}$ ), utilizando el gen TBP como gen endógeno.

## 5.8 Secuenciación

Los constructos generados (vector + insertos) en cada fase del clonaje y mutagénesis se secuenciaron para confirmar que se generaron mutaciones apropiadas y que no se produjeron mutaciones espontáneas durante el proceso. La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación Macrogen (Madrid, España). Para cada reacción de secuenciación, 2 µg de DNA plasmídico [100 ng / ml] diluido en MQ H<sub>2</sub>O, y 20 µl de cebadores previamente diseñados [60 ng / ml] (ver 3.5 Diseño de cebadores) se enviaron a las instalaciones de Macrogen a temperatura ambiente. Después de obtener los resultados, las secuencias se alinearon y analizaron mediante la herramienta <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=ProTeins>.

## 6. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en las células eucariotas. En la actualidad existen diferentes métodos físico-químicos que cumplen con este propósito, entre los cuales destacan: electroporación, precipitación fosfato cálcico o el uso de liposomas. En el presente trabajo, para la transfección de las líneas celulares se escogió en el método basado en liposomas, que consiste en sistemas vesiculares artificiales de composición fosfolipídica similar a la membrana plasmática, permitiendo al liposoma fusionarse a la membrana plasmática favoreciendo la distribución de las sustancias contenidas en su interior. En nuestro caso, se utilizó la transfección transitoria en aquellos casos en los cuales se pretendía que el ácido nucleico permaneciese en la célula durante un período de tiempo limitado (entre 24-72 horas). El material transfectado transitoriamente no se integra en el genoma, por lo tanto, no se transmite de generación en generación y se pierde durante la división celular. Sin embargo, un alto número de copias del material genético transfectado conduce a altos niveles de expresión de proteínas dentro del período en que existen en la célula.

Las células previamente sembradas, se transfectaron con el DNA plasmídico de interés y el reactivo de transfección polietilenimina (PEI), diluidos en 50 mM NaCl. PEI es un polímero utilizado para empacar y administrar DNA a las células a través del mecanismo de endocitosis. La densidad celular, así como la concentración de cada componente en la mezcla de transfección se determinaron por la naturaleza de cada experimento.

El protocolo general para la transfección transitoria se realizó de la siguiente manera. El DNA fue diluido en NaCl y se añadió el reactivo Polyetylenimine (PEI) (Polyscience Inc), dejándose incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla anterior fue añadida gota

a gota en las células sembradas. Las células transfectadas fueron incubadas over/night (O/N) a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Tras la incubación O/N, se cambió el medio de las placas por medio fresco, debido a que el PEI es tóxico para las células.



## 7. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES TRANSDUCIDAS DE FORMA ESTABLE

La transducción consiste en la introducción de material genético externo en las células eucariotas a través de diferentes métodos, como, por ejemplo, los vectores lentivirales. Los vectores lentivirales permiten, tanto *in vitro* como *in vivo*, introducir, integrar y expresar de forma estable, transgenes y otras secuencias, como por ejemplo los short-hairpin RNA (shRNA) en células quiescentes y proliferantes. Los lentivirus, que pertenecen al género de los retrovirus, utilizan la maquinaria celular del huésped para amplificar y empaquetar su material genético en partículas virales, por lo tanto, el vector viral empaquetado se entrega a la célula objetivo mediante fusión de membrana. Por lo tanto, las partículas víricas actúan como un vehículo portador del DNA de interés. En nuestro caso, se trata de vectores que representan el silenciamiento de *CLCN5* y sus respectivos controles, mediante secuencias de shRNA (Ver apartado 2.2 shRNA) y vectores para la sobreexpresión de *CLCN5*, así como sus mutantes y sus respectivos controles. Las partículas generadas en las células empaquetadoras, se liberan al medio de cultivo y se utilizan para infectar las células diana. Los shRNA son procesados por la célula, originando el siRNA (del inglés, small interfering RNA) correspondiente.

El procedimiento general para transducir líneas celulares consistió en una línea celular productora de lentivirus, co-transfectada transitoriamente con plásmidos lentivirales de tercera generación. Los componentes del sistema son: i) el plásmido de transferencia que codifica el gen de interés flanqueado por secuencias de repetición terminal larga (LTR) que permiten la integración en el genoma del huésped, ii) el plásmido de empaquetamiento que contiene los genes de VIH mínimamente necesarios para la producción de

virus y iii) el plásmido envolvente que codifica el virus de la estomatitis vesicular G (VSV-G) utilizado para garantizar la formación de partículas lentivirales altamente infecciosas. Una vez que las partículas fueron formadas y liberadas en el sobrenadante por la línea celular productora de lentivirus, fueron recolectadas y, sin determinar la concentración, utilizadas para transducir las líneas celulares objetivo. Después de la integración genómica del vector de transferencia, las células infectadas se seleccionaron, expandieron y caracterizaron.

### 7.1 Producción de partículas lentivirales

En este estudio, las células HEK293T se usaron como una línea celular productora de lentivirus porque son fácilmente transfectables y expresan altos niveles de proteínas.

Tanto para el silenciamiento de *CLCN5*, como para los mutantes de *CLCN5*, se generaron partículas lentivirales con shRNA utilizando plásmidos lentivirales de tercera generación. Las células HEK293T fueron sembradas a una densidad de 300.00 células/ cm<sup>2</sup> a una confluencia entre el 80-90% en placas de 150cm<sup>2</sup>. El DNA añadido a la placa fue de 6 mg totales, en la proporción 1:1:3:4 de los plásmidos vector, gag-pl, envelope y transfer respectivamente. El DNA fue diluido en 1200 µl de NaCl y se añadió 60 µl del reactivo PEI, dejándose incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla anterior fue añadida gota a gota en las células HEK293T. Las células transfectadas fueron incubadas O/N a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Tras la incubación O/N, se cambió el medio de las placas por medio fresco y se mantuvieron en cultivo 72 horas más a 33°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Esta temperatura es ideal para estabilizar las partículas lentivirales, aunque también se pueden producir a 37 ° C. La producción de

partículas lentivirales comenzó a las 24 h después de la transfección, sin embargo, alcanzaron su pico máximo a las 48 horas, estables hasta las 72 horas.

## 7.2 Transducción celular

Dado que la forma más precisa de evaluar el papel de *CLCN5* es en su entorno celular nativo, las líneas celulares derivadas del túbulo proximal humano RPTEC/TERT1 y HK-2 fueron elegidas para ser transducidas. Ambas líneas celulares contienen la maquinaria celular necesaria para la síntesis, plegamiento y control de calidad de *CLCN5*.

Para transducir células RPTEC/TERT1 y HK-2, se sembraron a una densidad  $0.42 \cdot 10^6$  células/ml en T-75 y se incubaron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Después de 6 h de siembra, se añadió polibreno (Sigma Aldrich, # TR-1003) [8 µg / ml] a las células para aumentar la eficiencia de la transducción neutralizando la repulsión de cargas entre las partículas lentivirales y la superficie celular. Las células se incubaron durante 2 horas a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Posteriormente, el sobrenadante de 48 h de las células HEK293T se recogió y se reemplazó con medio nuevo. A continuación, el sobrenadante viral se filtró con un filtro de 0,22 mm (Millipore, # SLGS033SS) y se suplementó con 10% de FBS, polibreno [8 µg / ml] y 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, # 01-340-1B). Este enriquecimiento del sobrenadante compensa el agotamiento del medio producido por las células HEK293T. Finalmente, se eliminó el medio de células RPTEC/TERT1 y HK-2 y se añadió el sobrenadante viral suplementado y filtrado. Las células fueron incubadas a 33 ° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Este proceso se repitió a las 72 h sin eliminar el sobrenadante viral de 24 h, sin embargo, en este punto, las células HEK293T se descartaron apropiadamente. Después de

24h de la transducción de 72 horas, se eliminó el sobrenadante viral en las células RPTEC/TERT1 y HK-2, y se añadió medio fresco suplementado con los antibióticos de selección (ver 1.3 Cultivos). Las líneas celulares RPTEC/TERT1 y HK-2 se incubaron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad hasta que se completó la selección de las células transducidas.

## 8. TÉCNICAS PROTEICAS

### 8.1 Extracción de proteínas

Las proteínas son macromoléculas esenciales que consisten en una o más cadenas largas de residuos de aminoácidos que participan en prácticamente todos los procesos dentro de los organismos, por lo tanto, representan un amplio campo de estudio que proporciona información crucial sobre el funcionamiento de las células. En la actualidad, las proteínas se pueden extraer de las células usando una variedad de técnicas, sin embargo, dado las características de las proteínas de interés, se utilizó un método de lisis basado en detergentes. En este trabajo, se usó el tampón de lisis SET 1x y se preparó de la siguiente manera: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA (Sigma Aldrich # ED255) pH 8.0, 150 mM NaCl (Panreac # 1469941214), 1% SDS (Panreac # A0675). Cada componente del tampón de lisis tiene diferentes propósitos, por ejemplo, NaCl mantiene la presión osmótica cerca de condiciones fisiológicas y el SDS es un detergente aniónico que altera las membranas celulares. La obtención de los extractos de proteínas a partir de células de cultivo se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo. En primer lugar, se recogió el medio de cultivo mediante aspiración y se lavaron las células con PBS 1x, después se añadió el volumen adecuado del tampón de lisis y se transfirió en un eppendorf. A continuación, se sonicaron las muestras durante 15 segundos y 100 de amplitud. Una vez finalizada la extracción proteica, se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para futuras aplicaciones.

## 8.2 Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras

La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Este método colorimétrico determina la concentración de proteína mediante un cambio de color en proporción a una concentración de proteína conocida (estándar de albúmina, Tabla 14). El ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Thermo Scientific™, # 23225) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, el estándar de albúmina se preparó de la siguiente manera:

Tabla 14. Estándar de albúmina

<b>BSA (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>BSA Stock (<math>2\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Tampón de lisis (<math>V_f= 10 \mu\text{L}</math>)</b>
<b>0</b>	-	10 $\mu\text{L}$
<b>0.4</b>	2 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$
<b>0.8</b>	4 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$
<b>1.2</b>	6 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
<b>1.6</b>	8 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
<b>2.0</b>	10 $\mu\text{L}$	-

A continuación, se preparó una mezcla del reactivo A y del reactivo B siguiendo una proporción 1:50, respectivamente. Finalmente, se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de las diferentes muestras a cuantificar junto con el estándar de albúmina y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de BCA (por pocillo) en una placa transparente de 96 pocillos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a 37°C y continuación se leyó la absorbancia a 562 nm. La concentración de proteína se determinó restando la absorbancia promedio del estándar en blanco de la absorbancia de las muestras y trazando los valores corregidos para cada estándar de albúmina frente a su concentración en  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ . Una vez determinada la concentración de las proteínas, se procedió a la preparación de las muestras para su posterior análisis. Al volumen de muestra, que contenía la cantidad de proteína deseada, se le añadió tampón

de carga Laemmli 5x (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 mM EDTA, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.01% Azul de Bromofenol) para que su concentración final del tampón de carga fuese de 1x. El tampón Laemmli es un tampón que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) que se usa para preparar (desnaturalizar) muestras para SDS-PAGE. El DTT y el SDS son agentes reductores que desnaturalizan las proteínas y les da una carga negativa uniforme. El glicerol aumenta la densidad de las muestras, y el azul de bromofenol sirve como un frente de colorante que se adelanta a las proteínas para visualizar las muestras durante la carga. Finalmente, las muestras se hirvieron 5 minutos a 95°C, para garantizar su desnaturalización completa.

### 8.3 Análisis de proteínas por SDS-Page y Western Blot

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es una de las técnicas analíticas más utilizadas en la biología molecular y permite la separación de las proteínas según su peso molecular. La electroforesis requiere la formación de un hidrogel, compuesto por una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida polimerizada, que permite separar las proteínas según su carga, forma y tamaño cuando se expone a un campo eléctrico. La presencia de SDS, un detergente anfipático con una cabeza aniónica y una cola lipofílica, desnaturaliza las proteínas de manera que pierden su estructura terciaria dando lugar a proteínas lineales. Por otra parte, el SDS se une no covalentemente a las proteínas con un ratio aproximada 1:2 SDS:aminoácidos agregando en las proteínas una carga neta negativa. Se utilizó el sistema de electroforesis vertical mini-Protean 3 de la casa comercial BIO-RAD. Según el peso molecular (Tabla 15) de las proteínas de interés se utilizaron geles de entre 7.5 y 15% de poliacrilamida, y se trabajó bajo condiciones desnaturalizantes.

Tabla 15. Concentración de poliacrilamida utilizada en los geles según la medida de la proteína de interés.

Medida de la proteína (KD)	% Policrilamida
10-30	15
30-100	12
>100	7.5

Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida al porcentaje pertinente (Tabla 16), se cargaron las muestras y se procedió a la electroforesis a un voltaje constante de 100V en tampón de electroforesis (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%). Una vez separadas las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinil (PVDF) (Westran<sup>®</sup> S. Whatman, # 10413096) para poder ser inmunodetectadas. Para que las proteínas se puedan adherir a la superficie de la membrana, ésta tiene que ser tratada con metanol al 100% y lavada con tampón de transferencia (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%) para hidratarla. La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100V durante 60 minutos en tampón de transferencia (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). Posteriormente se bloquearon con 5% leche desnatada en polvo (Central Asturiana) o 5% BSA disuelto en tampón PBS-Tween (del inglés, Phosphate-buffered saline, 2.5 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mMNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween-20 (Panreac, A4974)) durante 1h. Dependiendo del anticuerpo y las recomendaciones del fabricante, las condiciones de incubación variaron ligeramente (Tabla 17). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en PBS con 5% de BSA y 1% de azida sódica durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos en agitación con tampón PBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horse Radish*



*Peroxidase*) durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente en PBS-Tween con leche desnatada al 5%. Después de los lavados, las membranas se incubaron durante 4 min a temperatura ambiente con el reactivo Immobilon Forte Western HRP substrate (WBLUF0500). Las bandas proteicas de la membrana se visualizaron por exposición en el aparato Odyssey<sup>®</sup> Fc Imaging System y sus intensidades se midieron por densitometría usando el software Image Studio Lite.

Tabla 16. Volumen necesario para la preparación de 2 geles para SDS-PAGE.

Gel Separador					Gel Concentrador	
	7.5%	10%	12%	15%		
30% acril/0,8% bis (ml)	3.75	5	6	7.5	30% acril/0,8% bis	0.78
4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8 (ml)	3.75	3.75	3.75	3.75	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (ml)	1.5
H <sub>2</sub> O (ml)	7.5	6.25	5.25	3.75	H <sub>2</sub> O (ml)	3.66
10% PA (μL)	100	100	100	100	10% PA (μL)	60
TEMED (μL)	10	10	10	10	TEMED (μL)	12

Tabla 17. Listado de anticuerpos utilizados para la inmunodetección para Western Blot.

Anticuerpo	Procedencia	Tipo	Solución Incubación	Dilución	Casa comercial	Referencia
<b>CLC-5</b>	Conejo	Policlonal	BSA	1:1000	Avivasybio	OAAN0146
<b>HA</b>	Rata	Policlonal	BSA	1:1000	Roche	867423001
<b>B-Tubulina</b>	Ratón	Monoclonal	Leche	1:5000	Sigma	T4026
<b>Flag</b>	Ratón	Monoclonal	PBS-T	1:10000	Sigma	F1804
<b>HRP anti mouse</b>	Conejo	Policlonal	Leche	1:5000	Dako	P0260
<b>HRP anti rabbit</b>	Cabra	Policlonal	Leche	1:5000	Dako	P0448
<b>HRP anti rat</b>	Cabra	Policlonal	Leche	1:5000	Sigma	A9037

#### 8.4 Inmunofluorescencia y microscopia confocal

La inmunocitoquímica (ICC) es una técnica utilizada para visualizar la localización de una proteína específica dentro de las células. La detección de proteínas generalmente se realiza mediante fluorescencia a través de su visualización en el microscopio confocal utilizando anticuerpos conjugados con un fluoróforo. La microscopía confocal permite la reconstrucción de estructuras tridimensionales mediante la captura de múltiples imágenes a diferentes profundidades, lo que permite determinar en qué compartimento subcelular se expresa la proteína específica.

Las inmunofluorescencias se realizaron en células sembradas al 100% de confluencia sobre cubreobjetos de vidrio estériles (SG, # LAB550012C). Las células se lavaron con PBS frío para eliminar los restos de medio de cultivo. La fijación se realizó con metanol durante 5 min a -20°C. Después de lavar con PBS tres veces, las células se bloquearon con la solución 50 mM NH<sub>4</sub>Cl pH 7.4 en PBS durante 30 min para eliminar la auto-fluorescencia. A continuación, las células se bloquearon durante 1 h con solución de bloqueo [PBS con 5% de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*)]. Para la detección de proteínas de interés, los anticuerpos primarios (Tabla 18) se diluyeron en solución de bloqueo y se depositaron 25 µl de anticuerpo primario en un parafilm. A continuación, se colocaron los cubreobjetos cuidadosamente boca abajo sobre la gota de anticuerpo con cuidado de no formar burbujas. Los cubreobjetos se incubaron O / N a 4 ° C en la oscuridad. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento con la incubación de los anticuerpos secundarios (disueltos en PBS con 5% de BSA) durante 1h a temperatura ambiente (Tabla 19). Para la visualización de los núcleos, se preparó una solución 1:2000 de Hoechst 33342 (Invitrogen, # H1399) en solución de bloqueo. Se incubaron los cubreobjetos durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Seguidamente, se lavaron con PBS y

se montaron en el medio de montaje ProLong Diamond AntiFade (Thermofisher, # P36961), las muestras se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta el análisis. Las imágenes se capturaron en el servicio de microscopia confocal de la Unidad de Ata Tecnología (UAT) del Hospital Universitari Vall d'Hebrón con el microscopio confocal Olympus FV1000. El procesamiento se llevó a cabo con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EEUU).

*Tabla 18. Listado de anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección para Inmunocitoquímica*

<b>Anticuerpo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>HA</b>	Rata	1:100	Roche	86742300 1
<b>KDEL</b>	Ratón	1:100	Abcam	Ab10C3
<b>Rab5</b>	Conejo	1:100	Cell-Signaling	3547S
<b>N-Caherina</b>	Ratón	1:100	BD Transduction Labs	610920
<b>LAMP1</b>	Ratón	1:100	Santa Cruz	SC 20011
<b>Cubilina</b>	Cabra	1:100	Santa Cruz	SC 23644
<b>Megalina</b>	Conejo	1:100	Santa Cruz	SC 25470

Tabla 19. Listado de anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección para Inmunocitoquímica

<b>ANTICUERPO</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>Anti-Mouse Alexa 488</b>	Goat	1:500	Invitrogen	A28175
<b>Anti-Mouse Alexa 568</b>	Goat	1:500	Invitrogen	A11004
<b>Anti-Rabbit Alexa 568</b>	Goat	1:500	Invitrogen	A11011
<b>anti-Rabbit Alexa 488</b>	Goat	1:500	Invitrogen	A27034
<b>Anti-Rat Alexa 647</b>	Goat	1:500	Invitrogen	A21247
<b>Anti-Goat Alexa 488</b>	Rabbit	1:500	Invitrogen	A27012

## 9. ENSAYOS FUNCIONALES

### 9.1 Ensayos de endocitosis

Para el estudio del proceso de endocitosis se analizó la captación de albúmina y transferrina mediante técnicas cualitativas de microscopia confocal o cuantitativas mediante fluorometria

#### 9.1.2 Ensayos de endocitosis mediante microscopia confocal

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio estériles a una densidad de  $0.1 \cdot 10^6$  células/ml y cultivadas durante 7 días para que estuvieran polarizadas. Las células se trataron con 50µg/mL transferrina conjugada a Alexa Fluor 568 (Thermofisher, #T13343) durante 15 minutos o con 50µg/mL albúmina conjugada a Alexa Fluor 488 (Thermofisher, #A13100) durante 60 minutos a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Tras la captación, las células se lavaron 6 veces con PBS y se fijaron con metanol durante 5 min a -20°C. A continuación, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios O/N a 4°C. Al día siguiente se realizó la incubación de los anticuerpos secundarios (disueltos en PBS) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron con PBS y se montaron en el medio de montaje ProLong Diamond AntiFade (Thermofisher, P36961). Las imágenes se captaron en el servicio de microscopia confocal de la Unidad de Ata Tecnología (UAT) del Hospital Universitari Vall d'Hebrón con el microscopio confocal Olympus FV1000. El procesamiento se llevó a cabo con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EEUU).

### 9.1.3 Ensayos de endocitosis mediante fluorometria

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $0.1 \cdot 10^6$  células/ml y cultivadas durante 7 días para que estuvieran polarizadas. Las células se trataron con  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  de albúmina conjugada a Alexa Fluor 488 (Thermofisher, #A13100) durante 60 minutos a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad. Tras la captación, las células se lavaron 6 veces con PBS y se lisaron con el buffer de lisis (20mM MOPS, 0.1% Tritón en PBS). La fluorescencia intracelular se midió en un fluorímetro (Varioskan LUX multimode reader, Thermofisher) a una longitud de onda de excitación de  $485 \pm 10$  nm y una longitud de onda de emisión de  $530 \pm 10$  nm. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la concentración de proteína. La concentración de proteína se determinó mediante el método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #232215) siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior lectura en una placa de 96 pocillos. Los resultados se expresaron como fluorescencia / miligramo de proteína. Para los ensayos de competición, las células fueron tratadas se incubaron simultáneamente con albúmina no marcada de 5 mg/ml durante el ensayo de endocitosis, y se determinó la absorción de albúmina fluorescente. La captación de albúmina y los ensayos de competencia se expresaron respecto a la captación de las células control con o sin competencia. Los valores de significación se calcularon mediante T-Student.

## 9.2 Tratamiento con Bafilomicina A-1

Para estudiar el efecto que produce la inhibición de la V-ATPasa en el proceso de captación de albúmina se realizaron tratamientos con Bafilomicina A1, un inhibidor de la V-ATPasa en células RPTEC WT. Las células fueron

sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $0.1 \cdot 10^6$  células/ml y cultivadas durante 7 días. Antes del tratamiento, las células se lavaron con PBS. A continuación, se trataron con 200nM de Bafilomicina-A1 (Sigma, # B1793) y con 50 $\mu$ g/mL de albúmina conjugada a Alexa Fluor 488 (Thermofisher, #A13100) en medio de cultivo y se incubaron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 60 minutos. Tras la captación, las células se lavaron 6 veces con PBS y se lisaron con el buffer de lisis (20mM MOPS, 0.1% Tritón en PBS). La fluorescencia intracelular se midió en un fluorímetro (Varioskan LUX multimode reader, Thermofisher) a una longitud de onda de excitación de  $485 \pm 10$  nm y una longitud de onda de emisión de  $530 \pm 10$  nm. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la concentración de proteína. La concentración de proteína se determinó mediante el método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #232215) siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior lectura en una placa de 96 pocillos. Los resultados se expresaron como fluorescencia / miligramo de proteína. Los valores de significación se calcularon mediante T-Student.

### 9.3 Ensayos de degradación *in vitro*. Tratamientos con cicloheximida

Para estudiar la estabilidad de la proteína CLC-5 se realizaron tratamientos con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, que permitió el estudio de la vida media de la proteína CLC-5, tanto de la forma salvaje como de los diferentes mutantes generados. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $0.1 \cdot 10^6$  células/ml y cultivadas durante 7 días. Antes del tratamiento, las células se lavaron con PBS. A continuación, se trataron con 10  $\mu$ g/ml de cicloheximida (Sigma, # 01810) en medio de cultivo y se incubaron a una temperatura de 37°C y en

una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 0, 1, 3, 6 y 12 horas. Seguidamente, se recogieron los extractos de proteínas a los diferentes tiempos siguiendo el protocolo descrito en el punto 8 (Manipulación de proteínas).

#### 9.4 Determinación del estado de glicosilación

El procesamiento intracelular de las proteínas mutantes de CIC-5 mutantes se determinó mediante su estado de glicosilación. Proteínas solubles aisladas de las líneas RPTEC/TERT, que expresan las proteínas CIC-5 WT o mutantes (p.V523del, p.E527D y p.I524K) se trataron con endoglicosidasa H (Endo H) y N-glicosidasa F (PNGasa F) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). Las proteínas extraídas se incubaron con Endo H, PNGasa F o vehículo, durante 4 horas a 37°C siguiendo las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente después de la digestión enzimática, las proteínas solubles se analizaron por Western Blot.

## 10. MICROARRAYS DE RNA

Un *microarray* consiste en una superficie (generalmente de vidrio) a la que se unen fragmentos de cDNA por hibridación con sondas específicas. Los *microarrays* se utilizan para medir los niveles de expresión de una gran cantidad de genes simultáneamente, dando así un perfil global de expresión génica. Su funcionamiento consiste, básicamente, en evaluar muchas (decenas de miles) diferentes secuencias de cDNA (objetivos) mediante hibridación con secuencias de DNA complementarias (sondas) contenidas en puntos. La hibridación entre las dos cadenas se produce mediante la



formación de enlaces de hidrógeno. A mayor complementariedad, más fuerte es la unión no covalente. La detección se produce a través de fluorescencia unida a las secuencias diana y la cuantificación relativa depende de la intensidad de la señal fluorescente de un punto. La identidad de cada sonda se conoce por su ubicación en la matriz.

En este trabajo, se utilizó una matriz Clariom D (Applied Biosystems, # 902922) para determinar genes diferencialmente expresados como resultado del silenciamiento y la sobreexpresión de diferentes mutaciones en el gen *CLCN5*. La matriz Clariom D cubre todos los genes bien anotados conocidos (> 20,000), lo que proporciona un estudio sólido de la expresión diferencial de genes entre muestras. Dado que el estudio de *microarrays* tiene como objetivo analizar el transcriptoma, se utilizó el cDNA resultante de la transcripción inversa del RNA total.

### 10.1 Diseño experimental

El objetivo principal del análisis de *microarrays* fue identificar los genes (y sus vías asociadas) que muestran cambios de expresión debido al impacto del silenciamiento del gen *CLCN5* y sus mutaciones. Para ello, se consideraron las siguientes condiciones experimentales:

Tabla 20. Condiciones experimentales utilizadas en el microarray

Condición experimental	Descripción
sh $\emptyset$ + $\emptyset$	Expresión endógena de <i>CLCN5</i> Vector silenciamiento y re-introducción vacíos
sh <i>CLCN5</i> + $\emptyset$	Ausencia (reducción) de <i>CLCN5</i> Contiene el vector silenciamiento y el vector de re-introducción vacío

<b>CLC5 WT</b>	Actividad normal de <i>CLCN5</i> Contiene el vector silenciamiento y el vector de re-introducción CLC-5 WT
<b>V523del</b>	Mutante de clase desconocida Contiene el vector silenciamiento y el vector de re-introducción con la mutación V523del
<b>E527D</b>	Mutante clase 2 Contiene el vector silenciamiento y el vector de re-introducción con la mutación E527D
<b>I524K</b>	Mutante clase 1 Contiene el vector silenciamiento y el vector de re-introducción con la mutación I524K

En este estudio se consideraron 6 condiciones experimentales con 5 réplicas cada una, por lo tanto, este estudio se basó en 30 muestras.

## 10.2 Preparación de las muestras e hibridación

Para preparar las muestras para el análisis de *microarrays*, se sembraron 200.000 células RPTEC/TERT1 por pocillo en una placa TC P6 y se cultivaron durante 10 días a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se procedió con la extracción de RNA tal y como se describió anteriormente (ver 5.2 Extracción de RNA). La cuantificación se realizó en el aparato BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, # G2939BA) en formato nanochip. El sistema Bioanalyzer 2100 es una herramienta de electroforesis capilar que se utiliza para determinar la cuantificación, la integridad y la pureza del RNA, DNA y proteínas. Los valores de concentración se obtuvieron como ng / µl. Para determinar la integridad del RNA, el Bioanalyzer asigna un número (RIN, del inglés *RNA Integrity number*) comprendido entre 0-10. El RNA total se retrotranscribió a cDNA utilizando el kit WT pico HT kit (Thermo Fisher, #3902622). El cDNA resultante

se fragmentó, se marcó y se hibridó usando el kit WT Array Strips (Thermo Fisher, #901667) Las muestras se hibridaron en los arrays Clariom™ D Assay (Affimetrix Inc., CA, EUA, #902922) a través de GeneTitan MC System (Affimetrix, #00-0373) en el servicio de genómica de la UAT (Unidad Alta Tecnología) del Institut de Recerca Vall d'Hebrón.

### 10.3 Control de calidad de las muestras

Después de la hibridación, los datos se sometieron a un control de calidad para verificar el rendimiento de todo el proceso de hibridación e identificar si los datos obtenidos eran adecuados para el proceso de normalización y apropiados para el análisis diferencial de expresión génica. Se realizaron diferentes tipos de control de calidad en las muestras de *microarrays*, incluyendo i) análisis de componentes principales (PCA) para identificar la presencia de problemas técnicos basados en la distribución de muestras; ii) *heatmaps* para determinar la distancia entre muestras en función de efectos biológicos, experimentales o técnicos; y iii) agrupamiento jerárquico para evaluar cómo se agruparon las muestras entre ellas según su similitud. Una vez que se realizaron los diferentes test para evaluar la calidad de las muestras, se determinó si alguna muestra se debía de eliminar. En este estudio, no se descartó ninguna muestra.

### 10.4 Pre-procesamiento de las muestras: normalización y filtrado

Para hacer que las muestras fueran comparables, así como para eliminar los sesgos técnicos, las muestras se preprocesaron utilizando el método robusto de análisis de *microarrays* (RMA). Además, los valores de expresión correspondientes a cada uno de los genes fueron promediados para

conseguir un único valor para cada gen. Una vez que las muestras se normalizaron, se realizaron algunas verificaciones de control de calidad. Para aumentar el poder estadístico y reducir el ruido innecesario, se eliminaron algunos genes que no se consideraron expresados o diferencialmente expresados. Para ello, se calcularon, ordenaron y representaron las desviaciones estándar de todos los genes, y se eliminaron aquellos genes cuyas desviaciones estándar estaban por debajo del percentil 65 de todas las desviaciones estándar.

### 10.5 Selección de los genes diferencialmente expresados

La selección de los genes expresados diferencialmente se basó en un modelo de análisis lineal con moderación empírica de Bayes de la varianza estimada. En la práctica, este es un método similar al uso de un "t-test", aunque específicamente desarrollado para el análisis de datos de *microarrays*. El análisis de Bayes establece determinados criterios para decidir qué genes se expresaron diferencialmente. Aquellos genes con un p-valor ajustado de menos de 0,05 y un valor absoluto de *logFC* de al menos 0.5 fueron considerados como diferencialmente expresados. Cada comparación generó una lista de genes ordenados de mayor a menor expresión diferencial. La representación de los perfiles diferenciales se realizó mediante *heatmaps*, que son diagramas rectangulares donde se representa la expresión de cada gen seleccionado (filas) a cada muestra (columnas) utilizando una escala de color que va de valores bajos a valores altos de expresión. Los genes que muestran un perfil similar entre condiciones son agrupados, proporcionando una forma visual de cómo los grupos de genes se encuentran sobreexpresados o infraexpresados.

## 10.6 Análisis de significancia biológica

Para identificar las vías de señalización asociadas con la expresión diferencial, se realizó un análisis de significación biológica en el servidor web g: Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) usando los filtros (adj.P.Value <0.05, logFC>0.5. Las funciones moleculares (FM), los componentes celulares (CC) y las funciones biológicas (FB) se determinaron utilizando la base de datos de Ontología Genética (GO), que es el recurso más utilizado para el análisis de enriquecimiento de vías. Se consideró estadísticamente significativo cuando el valor de P.P. <0.05.

## 11. IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTEICAS POR TÉCNICAS DE ESPECTOMETRÍA DE MASAS

Las interacciones proteína-proteína se dan en una gran variedad de procesos biológicos como la replicación, la transcripción, la secreción, la transducción de señales y el metabolismo. Por este motivo se han desarrollado una gran variedad de aproximaciones metodológicas para determinar la interacción entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo se utilizaron las técnicas de co-inmunoprecipitación y espectrometría de masas en extractos celulares para identificar nuevos complejos proteicos formados a partir de la interacción con la proteína CLC-5 WT o las mutaciones de estudio (p.V523del, p.E527D e p.I524K).

### 11.1 Ensayos de Co-inmunoprecipitación

La co-inmunoprecipitación es una técnica bioquímica que consiste en la precipitación de complejos proteicos y se fundamenta en el reconocimiento específico de una proteína (antígeno, Ag) por parte de un anticuerpo (Ac). El anticuerpo interacciona con unas microesferas de agarosa. Tras el

reconocimiento específico, el complejo microesfera-Ac-Ag puede precipitarse por centrifugación. Una vez precipitados, los complejos se lavan y se resuspenden para su posterior análisis (SDS-PAGE o espectrometría de masas (MS)).

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación, se sembraron las células RPTEC/TERT1 a una densidad de  $0.2 \cdot 10^6$  células/mL y se cultivaron durante 10 días a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Las líneas empleadas en este ensayo fueron las siguientes: shCLC5 (nuestro control negativo, mostrando las uniones inespecíficas), RCLC5wt, V523del, E527 e I524K. Las células se lisaron en 1mL de tampón de lisis (20mM Hepes pH 7.0, 5mM EGTA pH 8, 0.5% Nonidet P-40). 150mM NaCl y 10% Glicerol) que contenía inhibidores de proteasas (1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 1:200 Cocktel Inhibidor de Proteasas (Sigma, #P8340)) y se incubaron en rotación durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. A continuación, se cuantificaron los extractos y se ajustaron a una concentración de 3 mg/ml. A continuación, se equilibraron las microesferas de agarosa (Sigma, # 11815016001) con el tampón previamente utilizado. Las microesferas de agarosa están acopladas al anticuerpo monoclonal de rata (clon 3F10), y éste es capaz de reconocer la secuencia de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) derivada de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza humana (HA). Por lo tanto, las microesferas de agarosa se unieron a nuestra proteína fusionada (CLC-5-HA), permitiendo identificar las proteínas que se unieron a ella. Seguidamente, se incubó el extracto con las microesferas de agarosa O/N a 4°C en rotación. Al día siguiente, las microesferas con sus complejos asociados se lavaron 5 veces con tampón de lisis (20mM Hepes pH 7.0, 5mM EGTA pH 8, 0.5% Nonidet P-40). 150mM NaCl y 10% Glicerol) para su posterior disociación. Las proteínas se eluyeron de las microesferas añadiendo 80 µL de péptido HA

[1µg/µL] (Roche, #11 666 975 001) y se incubaron a 37°C en agitación durante 1h. En este estudio se emplearon 5 condiciones experimentales con 3 réplicas cada una, por lo tanto, este estudio se basó en 15 muestras.

### 11.2 Preparación de muestras y etiquetado TMT (Tandem mass tags)

Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por técnicas de espectrometría de masas en el instituto EMBL (The European Molecular Biology Laboratory). La espectrometría de masas es una técnica basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos los iones, se separan de acuerdo a su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Las muestras se prepararon siguiendo las indicaciones previamente descritas en <sup>132,133</sup>. De manera general, los puentes disulfuro de los residuos de cisteína fueron reducidos con ditioneitol (10 mM en 50 mM HEPES, pH 8.5) durante 30 min a 56°C, y seguidamente alquilados con 2-cloroacetamida (20 mM en 50 mM HEPES, pH 8.5) durante 30 minutos en oscuridad. Las muestras se sometieron a un proceso de digestión con tripsina (Promega, # V5111) durante toda la noche empleando una relación enzima:sustrato de 1:50. Los péptidos se marcaron con reactivo etiquetado TMT6plex (ThermoFisher, #90061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición del reactivo hidroxilamina al 5% durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT). Seguidamente, las muestras se combinaron con el reactivo TMT5plex. Para una limpieza adicional de las muestras, se utilizó una placa de elución OASIS<sup>®</sup> HLB (Waters). El fraccionamiento de fase inversa se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200 Infinity, equipado con una columna Gemini C18 (3 µm, 110 Å, 100 x 1.0 mm, Phenomenex).

### 11.3 Adquisición de datos de espectrometría de masas

Para la separación y cuantificación de iones se utilizó el equipo HPLC UltiMate 3000 RSLC nano LC (Dionex) equipado con cartucho de captura ( $\mu$ -Precolumn C18 PepMap 100, 5 $\mu$ m, 300  $\mu$ m i.d. x 5 mm, 100 Å) y una columna analítica (nanoEase™ M/Z HSS T3 column 75  $\mu$ m x 250 mm C18, 1.8  $\mu$ m, 100 Å, Waters). La separación cromatográfica se realizó en la columna analítica con un flujo constante de 30  $\mu$ L/min de disolvente A (0.1% de ácido fórmico en agua) durante 6 minutos. Posteriormente, los péptidos se eluyeron a través de la columna analítica con un flujo constante de 0.3  $\mu$ L/min con un porcentaje creciente de disolvente B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo) del 2% al 4% en 4 minutos, del 4% al 8% en 2 minutos, luego del 8% al 28% durante otros 37 minutos, y finalmente, del 28% al 40% en otros 9 minutos. La salida de la columna analítica se colocó directamente al espectrómetro de masas QExactive plus (Thermo) utilizando la fuente nanoflujo proxeon en modo de iones positivos.

Los péptidos se introdujeron en el QExactive plus mediante un emisor Pico-Tip 360  $\mu$ m OD x 20  $\mu$ m ID; 10  $\mu$ m tip (New Objective) y un voltaje pulverizado aplicado de 2.1kV. La temperatura capilar se fijó en 275°C. El análisis de masa completa se obtuvo con un rango de masa de 375-1200 m/z en modo de perfil con una resolución de 70000. El tiempo de llenado se estableció en un máximo de 10 ms con una limitación de 3x10<sup>6</sup> iones. La adquisición dependiente de datos (ADD) se realizó con la resolución del conjunto Orbitrap a 17500, con un tiempo de llenado de 50ms y una limitación de 2x10<sup>5</sup> iones. Se aplicó una colisión de energía normalizada de 32. Se utilizó un tiempo de exclusión dinámica de 30s. El algoritmo de emparejamiento de péptidos se estableció en “preferido” y la exclusión de carga “sin asignar”, se



excluyeron los cambios de carga 1, 5 – 8. Los datos de MS2 se adquirieron en modo de perfil.

#### 11.4 Análisis de datos

Los archivos con los datos obtenidos se procesaron con el lenguaje de programación R (ISBN 3-900051-07-0). Sólo se consideraron para el análisis las proteínas que se cuantificaron con al menos dos péptidos únicos en al menos dos de las tres réplicas. Las señales de iones tmt sin procesar se utilizaron para eliminar el *batch effect* usando la función ‘removeBatchEffect’ del paquete lima (PMID: 25605792). Los datos resultantes se normalizaron con una normalización de estabilización de varianza (vsn – PMID: 12169536). Las proteínas se consideraron como ‘hit’ cuando presentaban una ratio FDR (del inglés, false discovery rate) menor del 5% y un *fold change* mayor del 100% y se consideraron como ‘candidatos’ cuando presentaba una ratio FDR menor del 20% y un *fold change* mayor del 50%.

#### 11.5 Validación de los candidatos obtenidos

Para confirmar la interacción de las proteínas obtenidas a través de la técnica de espectrometría de masas, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células previamente co-transfectadas con los vectores de la proteína a validar y las diferentes formas de CLC-5 (WT y las mutaciones de estudio).

En primer lugar, fue necesario adquirir el vector de la proteína a validar, en nuestro caso, la proteína TMEM9. La proteína TMEM9 está clonada en un vector pCMV6-Entry (Origene, # RC200100) (Figura 18) y contiene un tag para detectar la proteína (FLAG/Myc).

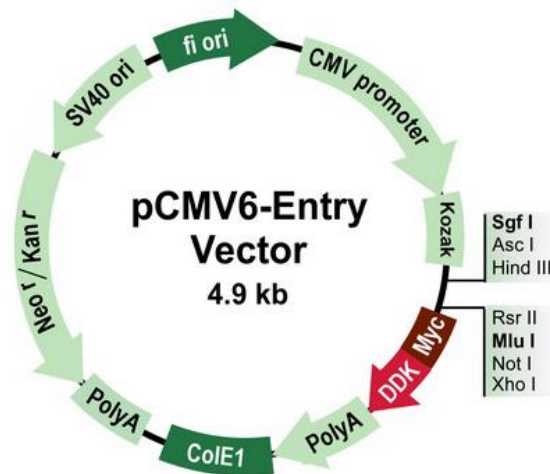


Figura 18. Mapa del vector pCMV6-Entry Vector.

Para confirmar la interacción entre TMEM9 y CLC-5, se realizó la técnica de co-inmunoprecipitación en ambos sentidos, es decir, utilizando anticuerpos contra CLC-5-HA y contra la proteína TMEM9-Flag. Para ello, se sembraron células HEK293T a una densidad de  $0.9 \cdot 10^6$  células/mL y a una confluencia del 90%, y se co-transfectaron con los vectores de expresión de la forma CLC-5 WT, la mutación p.523del, p.E527D y I.524K, así como con el vector de expresión para la proteína TMEM9. El protocolo para la transfección transitoria se realizó de la siguiente manera. El DNA añadido a la placa fue de 15 mg totales, en el ratio 1,25: 1,25 pmoles (Tabla 21). El DNA fue diluido en 1100  $\mu$ l de NaCl y se añadieron 55  $\mu$ l del reactivo PEI, dejándose incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla anterior fue añadida gota a gota en las células HEK293T. Las células transfectadas fueron incubadas O/N a una temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Tras la incubación O/N, se cambió el medio de las placas por medio fresco y se mantuvieron en cultivo 48 horas más a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

Tabla 21. Componentes transfección transitoria.

Muestra	Vector 1 1,25 pmols	Vector 2 1,25 pmols	NaCl	PEI
<b>RCLC5wt + TMEM9</b>	10,37 µg	4,5 µg	1100 µL	55 µL
<b>V523 + TMEM9</b>	10,37 µg	4,5 µg	1100 µL	55 µL
<b>E527 + TMEM9</b>	10,37 µg	4,5 µg	1100 µL	55 µL
<b>I524 + TMEM9</b>	10,37 µg	4,5 µg	1100 µL	55 µL
<b>pDEST (control)</b>	17,04 µg	-	1100 µL	55 µL

A continuación, las células se lisaron en 1mL de tampón de lisis (20mM Hepes pH 7.0, 5mM EGTA pH 8, 0.5% Nonidet P-40). 150mM NaCl y 10% Glicerol) que contenía inhibidores de proteasas (1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 1:200 Cocktel Inhibidor de Proteasas (Sigma, #P8340)) y se incubaron en rotación durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 14000 x g durante 10 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Posteriormente, se cuantificaron los extractos y se ajustaron a una concentración de 1mg/mL. Para reducir las uniones inespecíficas, se realizó un pre-aclarado del extracto. Para ello, se incubó el extracto con microesferas de agarosa de IgG de rata (Rockland Immunochem, # 12-0050) (IP-CLC-5 HA) y IgG de ratón (Sigma, # A2909) (IP-TMEM9-Flag) durante 2h a 4°C en rotación. Seguidamente, se centrifugaron las muestras durante 30 segundos a 1000 x g para recuperar el sobrenadante. Posteriormente, se mezclaron los extractos pre-lavados con las microesferas de agarosa anti HA (Sigma, # 11815016001) para la IP-CLC-5-HA o con las microesferas de agarosa anti-Flag (Sigma, # A2220) para la IP-TMEM9-Flag, y se incubaron O/N a 4°C en rotación. Al día siguiente, las microesferas con sus complejos asociados se lavaron 5 veces con tampón de lisis (20mM Hepes pH 7.0, 5mM EGTA pH 8, 0.5% Nonidet P-40). 150mM NaCl y 10% Glicerol) para su posterior disociación. Las proteínas se eluyeron de las

microesferas añadiendo 100  $\mu$ l de tampón de carga Laemmli 5x (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 mM EDTA, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.01% Azul de Bromofenol). Todas las muestras fueron procesadas para *western blot*.



# RESULTADOS

## 1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN *CLCN5*

La PBPM observada en los pacientes con la enfermedad de Dent constituye un biomarcador de disfunción del túbulo proximal. En este sentido, actualmente se atribuye un papel etiopatogénico relevante a las células del túbulo proximal (CTP) en la enfermedad de Dent. Sin embargo, los mecanismos que conducen a la fibrosis túbulo-intersticial en dicha enfermedad son aún desconocidos. Para intentar identificar estos mecanismos y para analizar el impacto de mutaciones en el gen *CLCN5* en CTP, generamos líneas celulares derivadas del túbulo proximal humano con el gen *CLCN5* silenciado o portadoras de mutaciones en dicho gen.

En este trabajo hemos utilizado las células RPTEC/TERT, una línea celular derivada del túbulo proximal inmortalizada mediante la expresión ectópica de la subunidad catalítica de telomerasa humana (hTERT)<sup>134</sup>. Esta línea celular representa uno de los mejores modelos celulares actualmente disponibles, dado que presenta la morfología característica y las propiedades funcionales de las células epiteliales tubulares proximales bien polarizadas, incluida la absorción de fosfato dependiente de sodio y la funcionalidad intacta del sistema de transporte de megalina/cubilina. Adicionalmente se han empleado las líneas HK-2, también derivadas del túbulo, ampliamente caracterizadas y utilizadas en numerosos trabajos, y por lo tanto, se dispone de mucha información bibliográfica.

Las líneas celulares inmortalizadas presentan una serie de ventajas respecto a los cultivos primarios derivados de pacientes, entre las que se incluyen la perpetuación del estado de diferenciación y la funcionalidad original a lo largo de la vida del cultivo celular. Estas células además proporcionan, a diferencia de células derivadas de pacientes, un fondo

genético uniforme no afectado por los polimorfismos o mutaciones en otros genes que podrían estar presentes en determinados individuos.

En cuanto a la elección de las mutaciones de estudio, se han seleccionado las mutaciones (p.V523del (c.1566-1568del), p.E527D (c.1581A>T) y p.I524K (c.1571T>A)). Esta elección de basa en la identificación de un paciente del HUVH portador de la mutación p.V523del que presenta una manifestación de la enfermedad muy acusada. En base a la localización de esta mutación (hélice P), hemos escogido dos mutaciones previamente descritas<sup>114</sup> en la misma hélice para comparar sus efectos.

En la figura 19 se muestra la estrategia utilizada en la generación de estos modelos celulares.

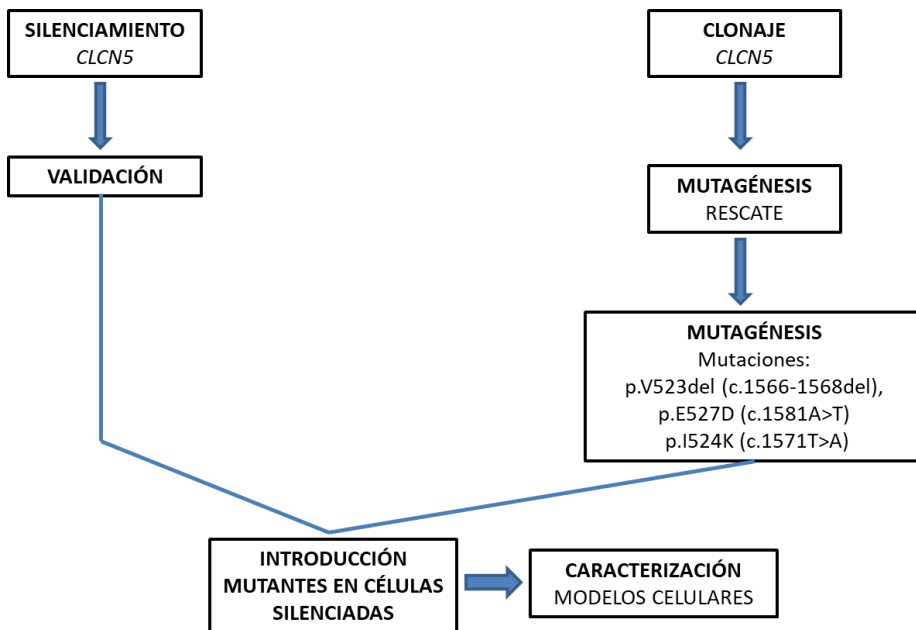


Figura 19. Estrategia empleada en la generación de los modelos celulares



## 1.1 Silenciamiento del gen *CLCN5* en células RPTEC/TERT

Para poder introducir las diferentes formas mutadas de *CLCN5* y analizar sus efectos, primero silenciamos el gen *CLCN5* endógeno mediante la transducción estable de shRNAs específicos contra el mRNA de *CLCN5* para promover su degradación. En este estudio, probamos 5 shRNA diferentes y evaluamos su eficiencia mediante RT-qPCR (Figura 20). Nuestros resultados mostraron que el shRNA4 fue el más eficiente en el silenciamiento de *CLCN5*. La eficiencia de silenciamiento en la línea RPTEC/TERT fue del 50% para el shRNA3, del 87% en el shRNA4 y del 68% en el shRNA5. La eficiencia del shRNA1 y 2 no se pudo cuantificar debido a la alta tasa de mortalidad que presentaron las células transducidas. Estos porcentajes se expresan respecto a la línea sh $\emptyset$ , que corresponde a la línea celular parental transducida con el vector lentiviral vacío (pLKO, control negativo de silenciamiento). En base a estos resultados, seleccionamos la línea celular transducida con el shRNA4. Adicionalmente, se intentó evaluar la eficiencia de silenciamiento analizando los niveles proteicos de CLC-5 en cada condición mediante Western Blot. Sin embargo, esto no fue posible debido a que los anticuerpos comerciales actualmente disponibles son altamente inespecíficos.

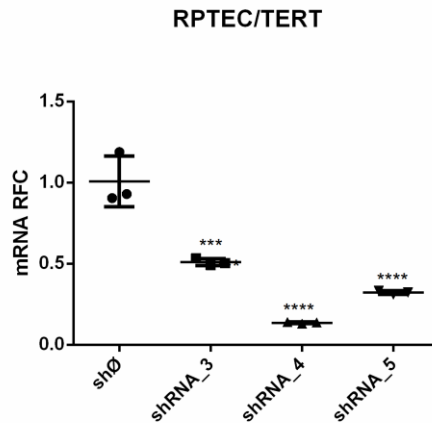


Figura 20. Silenciamiento del gen *CLCN5* endógeno en la línea celular RPTEC/TERT. RT-qPCR de la expresión del gen *CLCN5* después transducir la línea celular RPTEC/TERT con los diferentes shRNA. La línea shØ (transducida con el vector pLKO, vector lentiviral vacío) representa el control negativo de silenciamiento. Las barras de error representan medias de SEM. Comparaciones vs shØ, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.0003$ .

## 1.2 Re-introducción del CLC-5 WT y mutado en células RPTEC/TERT con el *CLCN5* endógeno silenciado

Una vez silenciado el gen de *CLCN5* endógeno, se procedió al clonaje del gen *CLCN5* mediante reacciones de recombinación utilizando el sistema Gateway® (Ver materiales y métodos). Una vez clonado el gen *CLCN5*, en primer lugar, se introdujeron mutaciones de rescate mediante mutagénesis de sitio dirigida. Esta estrategia consistió en generar mutaciones sinónimas en la secuencia reconocida por el shRNA4. La inserción de este tipo de mutaciones en la secuencia reconocida por el shRNA permite la re-introducción del gen *CLCN5* sin ser susceptible a la degradación. Este primer mutante corresponde a la forma WT de CLC-5 (RCLC5WT). Posteriormente, sobre este constructo se introdujeron cada una de las mutaciones de estudio: p.V523del (c.1566-1568del), p.E527D (c.1581A>T) y p.I524K (c.1571T>A). Antes de la transducción lentiviral de los mutantes *CLCN5*, los diferentes vectores se secuenciaron y alinearon usando la secuencia codificante del gen

*CLCN5* endógeno como molde. En la figura 21, se muestran el alineamiento de las secuencias de cada una de los constructos generados. Los pares de bases en rojo corresponden al mutante de "rescate" denominado RCLC5wt, en púrpura a la mutación p.V523del, en verde a las mutación p.E527D y en azul a la mutación p.I524K).

Nuestros resultados confirmaron que se generaron las mutaciones apropiadas y no se produjo ninguna otra mutación aleatoria durante la mutagénesis sitio dirigida.

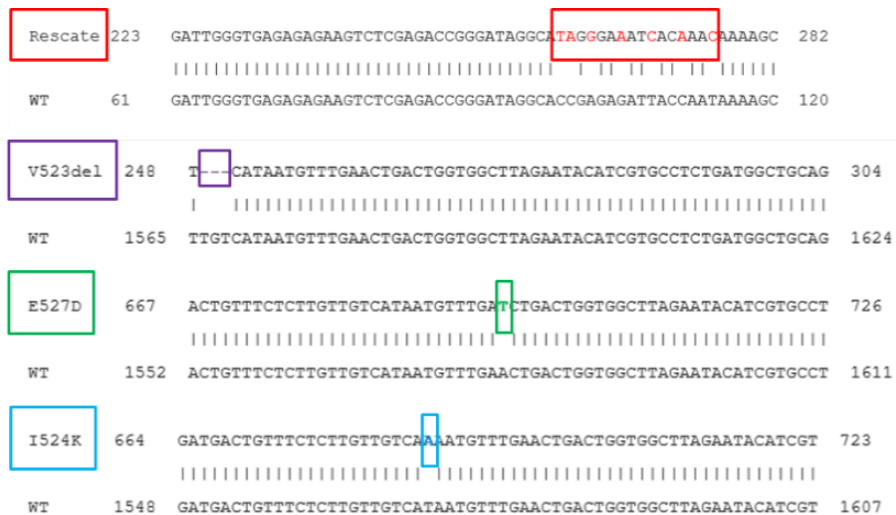


Figura 21. Secuenciación y alineación de los mutantes *CLCN5* en la línea RPTC/TERT.

Una vez realizada la transducción lentiviral de la forma WT y mutada de CLC-5 en células previamente silenciadas, evaluamos la expresión relativa de las diferentes formas de *CLCN5* re-introducidas por RT-qPCR (Figura 22). Para medir los niveles de expresión de *CLCN5* totales, se utilizó una sonda Taqman contra la secuencia codificante de *CLCN5*. Esta sonda, sin embargo, no nos permite diferenciar entre los niveles endógenos de *CLCN5* y los niveles

de *CLCN5* re-introducidos (formas WT o mutadas) en cada condición. Para analizar específicamente los niveles de *CLCN5* endógeno en las diferentes líneas, diseñamos cebadores específicos contra la secuencia diana del shRNA4, la cual se encuentra intacta en el mRNA del *CLCN5* endógeno, pero no en el mRNA de las formas re-introducidas. Igualmente, para detectar específicamente el *CLCN5* re-introducido o exógeno, diseñamos cebadores específicos contra la secuencia del epítipo HA, que únicamente se encuentra presente en las formas de *CLCN5* re-introducidas.

Como se puede observar en la figura 22A, todas las líneas celulares, excepto la línea control (sh $\emptyset$ + $\emptyset$ ), mantenían el *CLCN5* endógeno debidamente silenciado una vez re-introducidas las formas de *CLCN5* exógenas. De igual manera, en la figura 22B se puede observar que la re-introducción de *CLCN5* WT o mutantes resultó en una abundante expresión de *CLCN5*, confirmando que las formas exógenas podían escapar al efecto del silenciamiento. En este sentido, la figura 22C muestra que los niveles de expresión de las formas re-introducidas eran muy superiores a la expresión endógena (sh $\emptyset$ + $\emptyset$ ). Es importante destacar que no obtuvimos los mismos niveles de expresiones *CLCN5* en todas las condiciones (WT o mutado). Sin embargo, y como se acaba de mencionar, estos niveles siempre son muy superiores a los niveles endógenos.

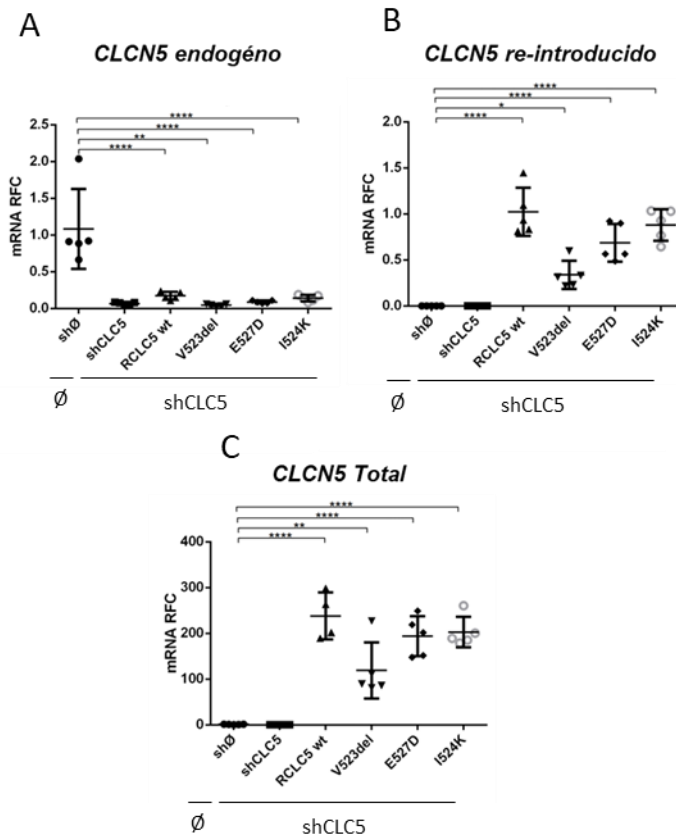


Figura 22. Niveles de expresión en los mutantes CLCN5 en la línea celular RPTEC/TERT mediante el uso de técnicas de qRT-PCR. La línea celular, fue transducida con el vector de silenciamiento y de sobreexpresión vacíos, por lo tanto, es la línea control (shØ+Ø). En cambio, la línea shCLC5 fue transducida con el vector lentiviral vacío de sobreexpresión, por lo tanto, representa el silenciamiento de CLCN5 (shCLC5+Ø). Las barras de error representan medias  $\pm$  SEM. Comparaciones vs shØ, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

Los niveles de CLC-5 WT y mutados re-introducidos en las células RPTEC/TERT fueron analizados a nivel de proteína mediante western blot (Figura 23). En este caso, si fue posible analizar los niveles proteicos de estas formas ya que, a diferencia de lo que ocurre con el CLC-5 endógeno, las formas re-introducidas llevan fusionado un epítipo HA tag contra el cual si se dispone de anticuerpos muy específicos. Como muestra la figura 23, se detectó la expresión de todas las formas de CLC-5 re-introducidas, observándose una

banda mayoritaria alrededor de los 80 KDa, lo que coincide con el peso molecular predicho para la proteína CLC-5. Es importante mencionar que la banda correspondiente al CLC-5 aparecía difusa o formando un “smear”. Este hecho, que puede ser más o menos apreciable en función de la exposición durante el revelado del western blot, es una consecuencia normal que se puede producir al correr proteínas asociadas a membrana en geles discontinuos.

Nuestros resultados también muestran que la forma CLC-5 WT presentó mayores niveles proteicos que las formas mutadas. Este hecho es especialmente relevante en el caso del mutante I524K, el cual presentaba los niveles de proteína más bajos entre los tres mutantes. Curiosamente, los niveles relativos de proteína CLC-5 en cada condición no se correspondieron con aquellos observados a nivel de mRNA, hecho que sugiere la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcional y/o post-traduccionales que afectarían la disponibilidad de proteína. Los dos primeros carriles corresponden a las líneas celulares control (sh $\emptyset$  +  $\emptyset$ ) y silenciada (shCLC5) que transducidas con el vector de sobreexpresión vacío, con lo que cabría esperar no se observó expresión de CLC-5.

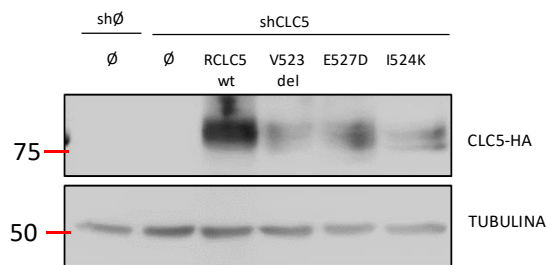


Figura 23. Niveles de expresión de la proteína CLC-5 en los mutantes CLCN5 en la línea celular RPTEC/TERT

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CLC-5 WT Y MUTADAS

Para estudiar si las mutaciones introducidas en el CLC-5 afectaban en alguna manera a las propiedades de la proteína, se analizó el estado de glicosilación, la vida media y la localización subcelular de la proteína WT y de las diferentes formas mutadas.

### 2.1 Glicosilación de la proteína CLC-5 WT y mutadas

Se ha descrito que la proteína CLC-5 sufre modificaciones post-traduccionales entre las que se incluyen procesos de glicosilación<sup>108</sup>. Para estudiar el patrón de glicosilación en las proteínas CLC-5 WT y mutadas, se trataron lisados celulares de las correspondientes líneas celulares con los enzimas Endoglicosidasa- H (Endo H) y N-peptidilendoglicosidasa F (PNGasa F). De esta manera, a través de la digestión con estas enzimas se puede obtener información sobre el estado de glicosilación de las proteínas. La actividad de la Endo H hidroliza el enlace entre las dos moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNAc). La endo H es activa sobre oligosacáridos de alto contenido en manosa, modificaciones típicas producidas en el ER<sup>135</sup>. Por el contrario, la PNGasa hidroliza el enlace N-glicosídico entre la GlcNAc y asparagina. Es activa sobre todo tipo de cadenas unidas N-glicosídicamente a glicopéptidos o glicoproteínas, incluidos glucanos completos procesados en el Aparato de Golgi<sup>136,137</sup>.

Nuestros resultados muestran que la digestión con la enzima endo H no produjo ningún efecto apreciable en ninguna de las formas (WT, p.523del y p.E527D) excepto en la mutación p.I524K donde se observa una tenue banda por debajo de los 80 KDa (Figura 24). En cambio, la digestión con la enzima PNGasa produjo un marcado efecto en todas las condiciones, observándose una disminución en el peso molecular de la proteína. Este hecho demuestra

que las proteínas CLC-5 WT y mutadas presentaban N-glicosilaciones entre GlcNAc y asparagina. Es interesante destacar que en el caso de la mutación p.I524K, la disminución en el peso molecular fue menor, tal y como que como se observa en la figura 24B la banda cae por encima de la línea discontinua que marca el peso molecular observado en la forma WT. Estos resultados sugirieren que la proteína CLC-5 I524K presentaba un menor grado de glicosilación sensible a la digestión con PNGasa, lo que podría sugerir un menor transito hacia el aparato de Golgi.

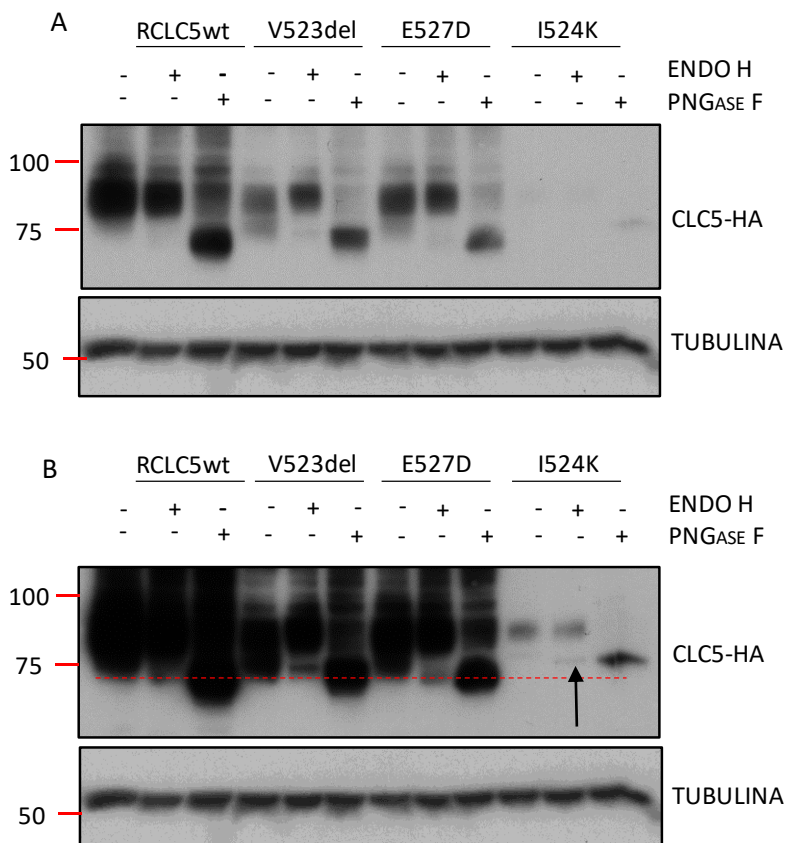


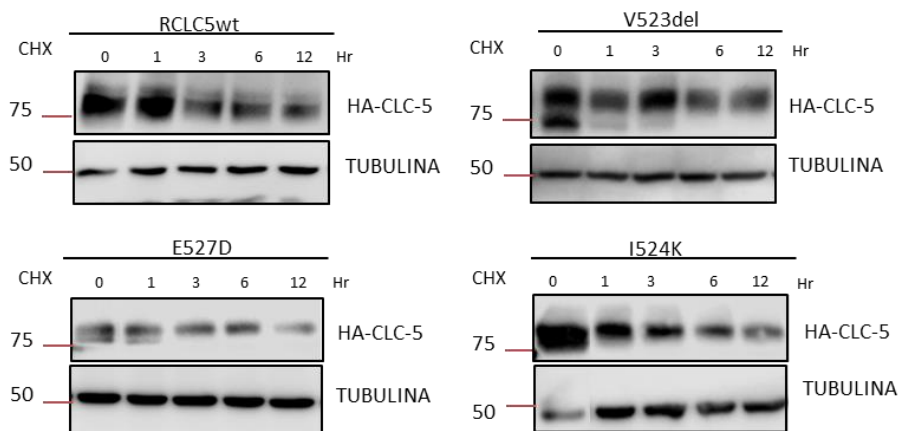
Figura 24. Biosíntesis y estado de glicosilación de proteínas de tipo WT y mutantes expresadas en células RPTC/TERT. Western Blot que muestra la expresión de proteínas de tipo WT y mutantes después de la digestión con las enzimas Endo H y PNGasa F.



## 2.2 Efecto de las mutaciones en *CLCN5* en la estabilidad de la proteína CLC-5.

Para examinar el efecto de las mutaciones en la estabilidad de CLC-5, se analizó la vida media de las formas WT o mutadas. Para ello se trataron las diferentes líneas celulares con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, y se recogieron lisados celulares a diferentes tiempos. De esta manera se inhibe el recambio proteico y los niveles de proteína van desapareciendo a lo largo del tiempo a medida que se degrada. A continuación, los niveles proteicos de CLC-5 se analizaron en las muestras obtenidas mediante western blot utilizando el anticuerpo anti-HA.

Nuestros resultados muestran en la figura 25 que, en estas condiciones experimentales, los niveles de proteína CLC-5 WT llegaron al 50% en aproximadamente 3h. En el caso de la proteína CLC-5 V523del se obtuvieron resultados similares a los de la forma WT. Curiosamente la mutación p.E527D provocó un leve incremento en la estabilidad de la proteína. Por el contrario, el mutante I524K presentó una vida media inferior al resto de formas.



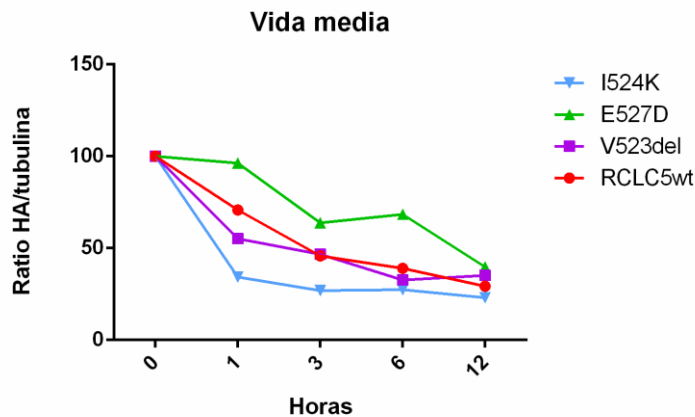


Figura 25. Las mutaciones presentan una menor estabilidad de la proteína CLC-5. Las diferentes líneas celulares generadas fueron tratadas a distintos tiempos con 10 $\mu$ g/mL de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas. A) En cada punto se obtuvo el extracto proteico y se analizó por SDS-Page y Western Blot. La inmunodetección se llevó a cabo con el anticuerpo HA siguiendo el protocolo que se describe en los métodos. B) Representación gráfica de los datos densitométricos y normalizados respecto a la expresión de tubulina. La cantidad de CLC-5 a las 0 horas se definió como el 100% y los datos se normalizaron con los niveles de la proteína tubulina. Las vidas medias de ambas proteínas se encuentran indicadas.

### 2.3 Localización subcelular del CLC5 WT y mutado.

Para estudiar si las diferentes mutaciones alteraban la distribución subcelular de la proteína CLC-5 re-introducida, se realizaron estudios de co-localización mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra el tag HA y contra marcadores específicos de los distintos compartimentos subcelulares.

Nuestros resultados muestran que, al igual que ocurría en el western blot, se observaba una señal más intensa, y por lo tanto un mayor nivel de proteína, en la condición WT respecto al resto de mutantes (Ver paneles HA, Figura 26). En todos los casos se observó una distribución de CLC-5 más intensa alrededor del núcleo, junto a un patrón punteado menos intenso distribuido a lo largo de la célula. En el caso del CLC-WT se observó además

una pequeña fracción de CLC-5 localizando en lo que parecía ser la membrana plasmática. Esta distribución en la membrana se confirmó al observarse la co-localización de CLC-5 con N-Cadherina, una proteína integral de membrana ampliamente utilizada como marcador de dicho compartimento. Por el contrario, la localización en membrana no se observó para ninguno de los mutantes.

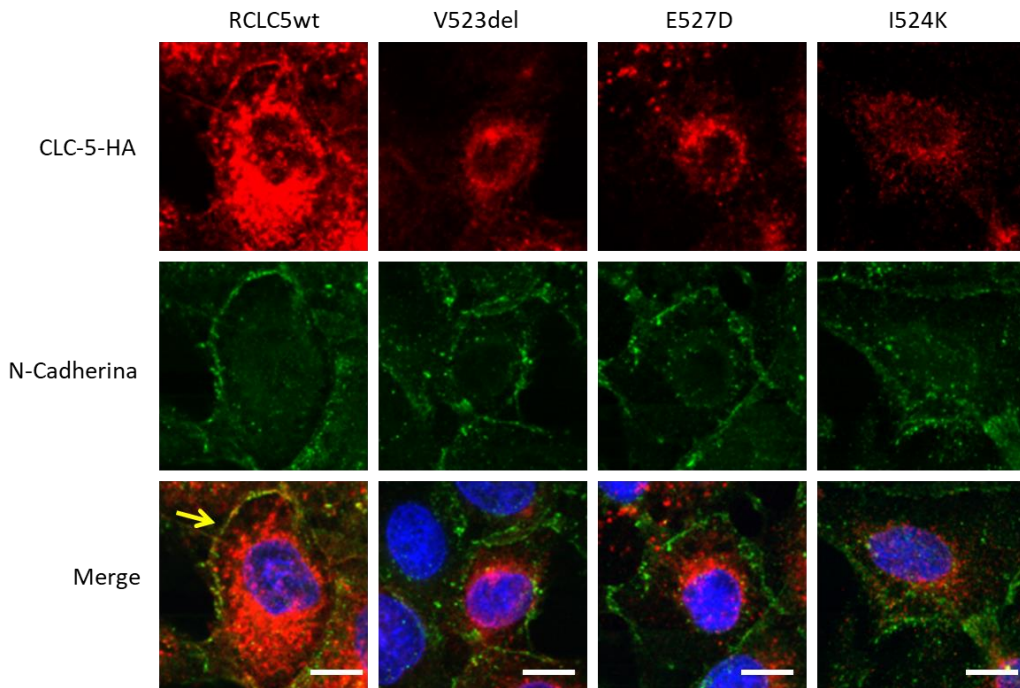


Figura 26. Colocalización de CLC-5 con membrana plasmática en las células RPTC/TERT1. CLC-5 co-localiza con N-Cadherina (marcador de membrana plasmática) en la línea RCLC5wt. En rojo: HA-CLC-5; En verde: N-Cadherina. En amarillo/naranja: se muestra la co-localización. Barra de escala= 10 $\mu$ m.

Para comprobar que la localización perinuclear se correspondía a un marcaje de retículo endoplasmático, se emplearon anticuerpos específicos contra el dominio KDEL, un péptido señal situado exclusivamente en el extremo C-terminal de proteínas residentes del retículo endoplasmático.

Nuestros resultados muestran en la figura 27 que tanto el CLC-5 WT como los diferentes mutantes co-localizaron en el péptido KDEL, lo que implica

que todas las formas están presentes en el retículo endoplasmático. En interesante destacar que el mutante I524K mostró un mayor grado de superposición (es decir una tonalidad más amarillenta) con KDEL que el resto de formas de CLC-5, sugiriendo que mutaciones en este residuo podrían provocar una mayor retención en el retículo endoplasmático.

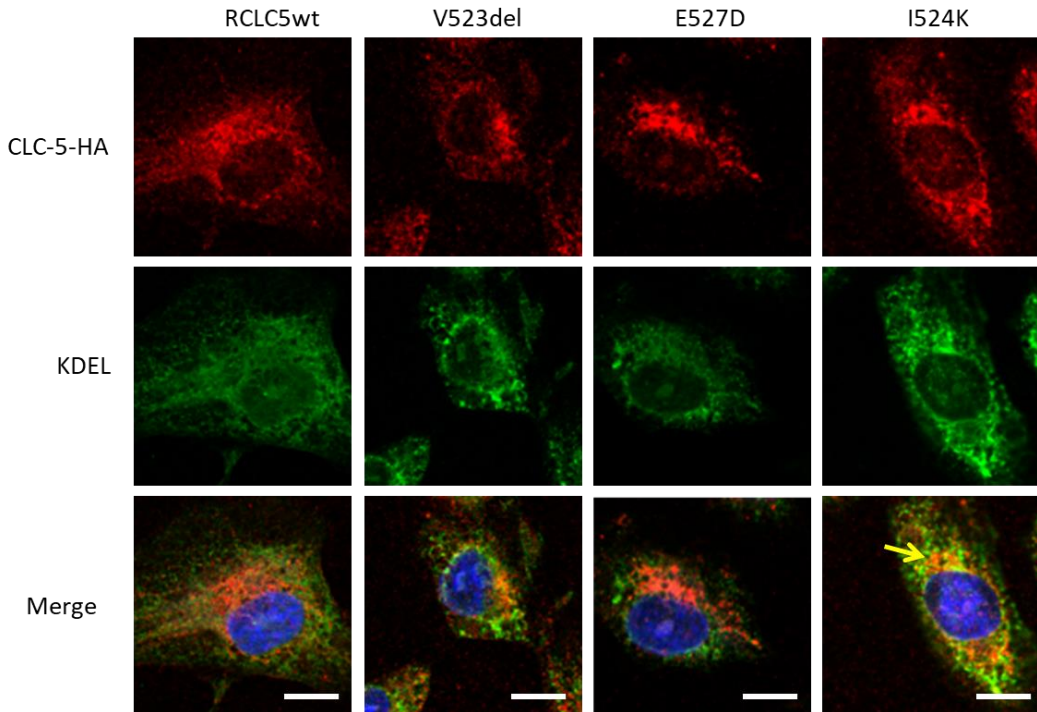
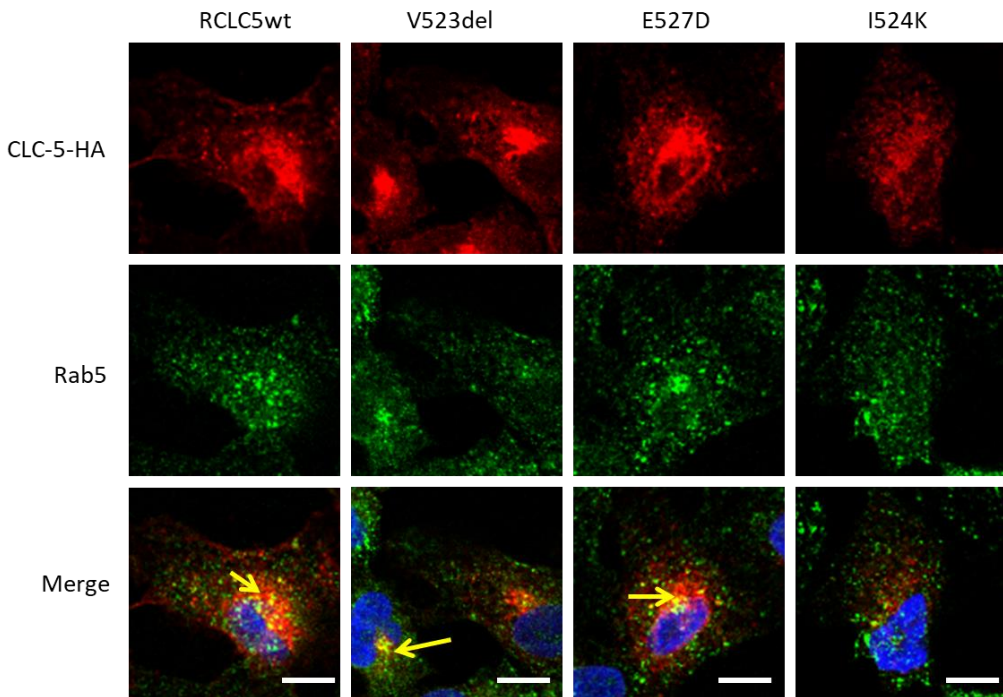


Figura 27. Co-localización de CLC-5 con Retículo Endoplasmático en las células RPTC/TERT1. CLC-5 co-localiza con KDEL (marcador de RE) en la mutación I524K. En rojo: HA-CLC-5; En verde: KDEL. En amarillo/naranja: se muestra la co-localización. Barra de escala= 10µm.

Del mismo modo, para comprobar si las diferentes mutaciones en CLC-5 afectaban a su localización en el compartimento endosomal se utilizaron anticuerpos contra Rab5, una proteína presente en endosomas primarios.

Los resultados presentados en la Figura 28, confirmaron que CLC-WT se localiza en endosomas ya que se observaba un punteado amarillo, resultado de las superposiciones de las señales de HA y Rab5. También se

observó que las formas CLC-5 con las mutaciones V523del y E527D también co-localizaban con Rab5, sugiriendo que estas mutaciones no afectaban la capacidad de CLC-5 para progresar hacia el compartimento endosomal. Por el contrario, la forma CLC-5 portadora de la mutación I524K no co-localizó con Rab5, sugiriendo que este mutante no se encuentra presente en endosoma. Estos resultados parecen confirmar que el mutante I524K quedaría retenido en mayor medida en el retículo endoplasmático y no progresaría hacia la vía endocítica.



*Figura 28. Co-localización de CLC-5 con Endosoma temprano en las células RPTC/TERT1. CLC-5 co-localiza con Rab5 (marcador de endosoma temprano) en la forma RCLC5wt y en la mutación V523del y E527D. En rojo: HA-CLC-5; En verde: Rab5. En amarillo/naranja: se muestra la co-localización. Barra de escala= 10µm.*

### 3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *CLCN5* O LA RE-INTRODUCCIÓN DE CLC-5 WT Y MUTADO EN LA ENDOCITOSIS DE ALBÚMINA Y TRANSFERRINA.

Las células de túbulo proximal reabsorben más del 80% de las proteínas del ultrafiltrado glomerular. Como se ha mencionado en la introducción, durante el proceso de filtración glomerular una pequeña fracción de la albúmina pasa al ultrafiltrado glomerular. Esta albúmina también será reabsorbida en el túbulo proximal. En este sentido, es importante mencionar que la albúmina ha sido tradicionalmente la proteína de elección para estudiar los mecanismos de endocitosis mediada por receptor en modelos celulares.

Para investigar si el silenciamiento de *CLCN5* o la re-introducción de las mutaciones de estudio afectaban a la capacidad endocítica de sus respectivas células se realizaron ensayos de captación de albúmina marcada fluorescentemente mediante técnicas cualitativas de microscopia confocal o cuantitativas mediante fluorometría.

#### 3.1 Estudio de la endocitosis mediante microscopia confocal

Las diferentes líneas celulares portadoras del gen *CLCN5* silenciado o mutado fueron cultivadas sobre cubreobjetos y posteriormente tratadas con albúmina<sup>488</sup>. Para confirmar que la albúmina se había endocitado y que, por tanto, se encontraba realmente en el interior de las células, se realizó una contra tinción con el anticuerpo N-cadherina, un marcador de membrana plasmática, para delimitar el perímetro celular. Las imágenes mostradas en la figura 29 corresponden a un apilamiento en Z (Z-stack), es decir, una superposición de los diferentes planos obtenidos con el microscopio confocal.

Nuestros resultados muestran que en la condición control y tras una hora de tratamiento con albúmina, ésta se internalizó correctamente. En el silenciamiento de *CLCN5* provocó una drástica disminución de la captación de albúmina. Al re-introducir la forma CLC-5 WT en las células previamente silenciadas, observamos una recuperación parcial de la capacidad endocítica. Estos experimentos de rescate demuestran que los efectos observados en células con el *CLCN5* silenciado eran específicos y no debidos a efectos “off-target”. Finalmente, la recuperación de la capacidad endocítica observada al re-introducir la forma WT no se produjo para ninguna de las formas mutantes estudiadas en esta tesis, confirmando que estas mutaciones alteraban de forma importante la capacidad endocítica de la célula.

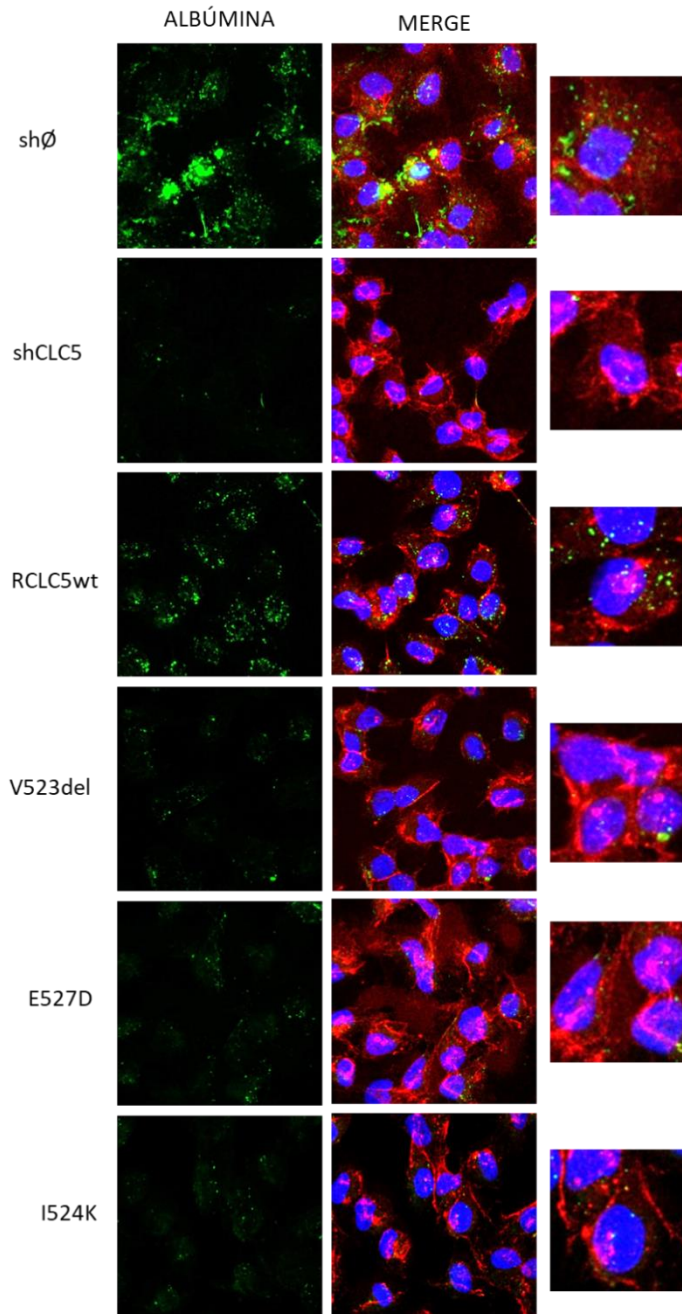


Figura 29. Efecto de las mutaciones y del silenciamiento de CLCN5 en la captación de albúmina en las líneas celulares RPTEC/TERT. Internalización de la albúmina (Verde) después de la exposición con albúmina marcada fluorescentemente durante 60 minutos en las líneas celulares RPTEC/TERT. Para demostrar que la albúmina se encontraba dentro de la superficie celular, se realizó una contra-tinción con el anticuerpo N-Cadherina para delimitar el perímetro celular. Barra de escala= 10µm.



Al igual que la albúmina, se ha descrito que la transferrina se absorbe en el túbulo proximal a través del receptor megalina/cubilina<sup>4</sup>. Para confirmar los resultados obtenidos con la albumina 488 se decidió estudiar la endocitosis de la transferrina<sup>594</sup> en estos mismos modelos celulares (Figura 30). Nuestros resultados muestran que al igual que la albumina, la transferrina es endocitada correctamente por las células RPTEC/TERT. Nuestros también muestran que, inesperadamente, el silenciamiento de *CLCN5* produjo un efecto muy leve en la captación de este ligando. En este mismo sentido, el efecto de la re-introducción de CLC-5 WT en la captación de transferrina fue poco apreciable. Sin embargo, sí que se apreció una disminución de la captación de transferrina respecto la condición control y un patrón de distribución más localizado. Esto parece indicar que, a diferencia de lo observado en el caso de la albúmina, en la captación de transferrina la introducción de estas mutaciones en el *CLCN5* no equivale a su silenciamiento.

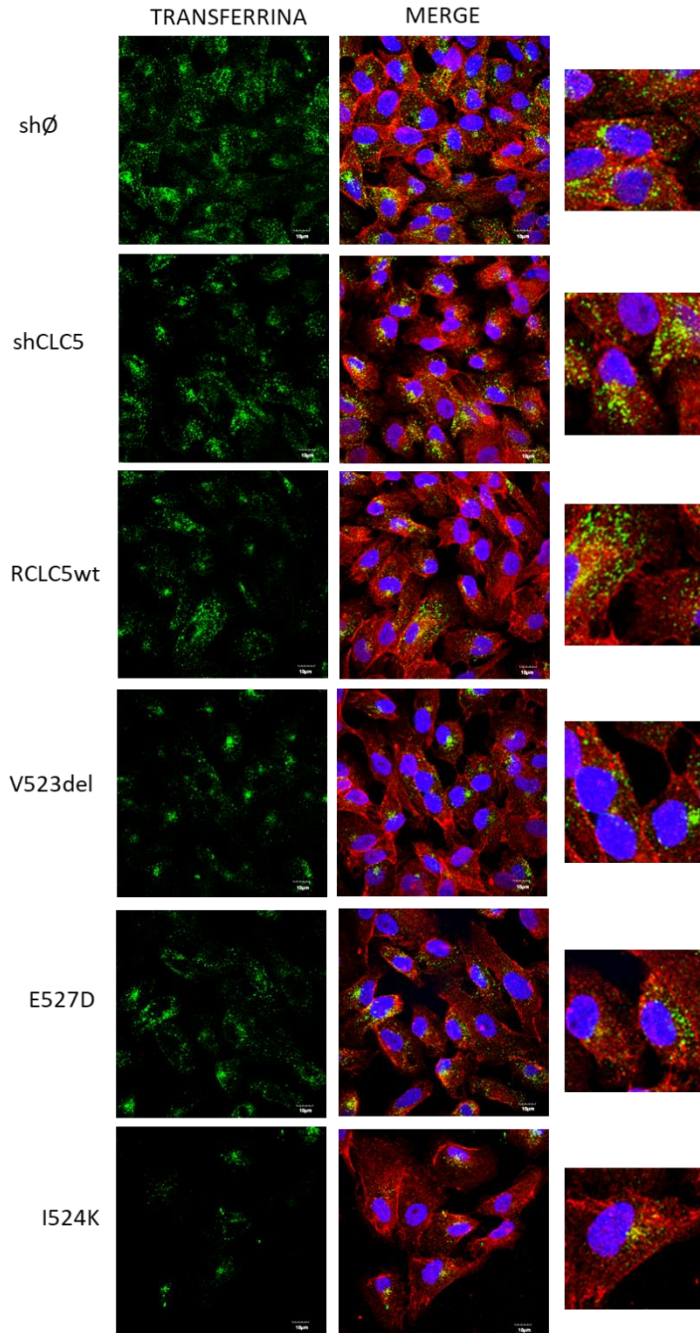


Figura 30. Efecto de las mutaciones y del silenciamiento de CLCN5 en la captación de transferrina en las líneas celulares RPTEC/TERT. Internalización de la albúmina (Verde) después de la exposición con albúmina marcada fluorescentemente durante 60 minutos en las líneas celulares RPTEC/TERT. Para demostrar que la transferrina se encontraba dentro de la superficie celular, se realizó una contra-tinción con el anticuerpo N-Cadherina para delimitar el perímetro celular. Barra de escala= 10µm

### 3.2 Estudio de la endocitosis mediante fluorometría

Con el objetivo de disponer de un ensayo de endocitosis que permita el cribaje de alto rendimiento (*high throughput screening*) de potenciales moléculas terapéuticas con capacidad de revertir el efecto de las mutaciones en CLC-5, se puso a punto un ensayo en placa. Para ello se sembraron las diferentes líneas celulares en placas de cultivo de 24 pocillos y se trataron con albumina marcada fluorescentemente, siguiendo el protocolo de Gorvin et al<sup>112</sup> con ligeras modificaciones. Se obtuvieron extractos celulares de estos cultivos y se cuantificaron los niveles de fluorescencia utilizando un fluorímetro. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la concentración de proteína. Para analizar la especificidad del tratamiento, se realizaron ensayos de competencia tratando simultáneamente las células con un exceso de albúmina no marcada.

En este sentido nuestros resultados muestran que para todas las líneas celulares el co-tratamiento con albumina no marcada produjo una drástica reducción en los valores de fluorescencia (Figura 31). Esto demuestra que ambos ligandos competían para un mismo receptor y que este era limitado. Sin embargo, a pesar de tratar las células con 100 veces más de albúmina no marcada, no se llegó a obtener una reducción total en los niveles de fluorescencia. Este hecho podría sugerir que existe otro mecanismo paralelo de entrada de albúmina independiente de receptor y no saturable. Nuestros resultados también muestran que el silenciamiento de *CLCN5* provocó una disminución significativa en los niveles de captación de albúmina respecto a la línea control, confirmando el papel clave de CLC-5 en la endocitosis mediada por receptor. De nuevo esta reducción no fue total, lo que parecería confirmar los resultados obtenidos con la albúmina no marcada.

Al rescatar la expresión de CLC5 WT en las células previamente silenciadas se restableció la capacidad endocítica, confirmando de nuevo que los efectos observados anteriormente eran específicos del silenciamiento de *CLCN5* y no debidos a efectos “off-target”. Al igual que en el silenciamiento, la re-introducción de los mutantes V523del y p.I524K no fue capaz de recuperar los niveles de fluorescencia observados en la condición control, sugiriendo que estas mutaciones afectan la capacidad endocítica de la célula. Curiosamente, y a diferencia de lo observado con las técnicas de microscopia confocal, la re-introducción de la mutación p.E527D sí que fue capaz de restablecer los valores de fluorescencia.

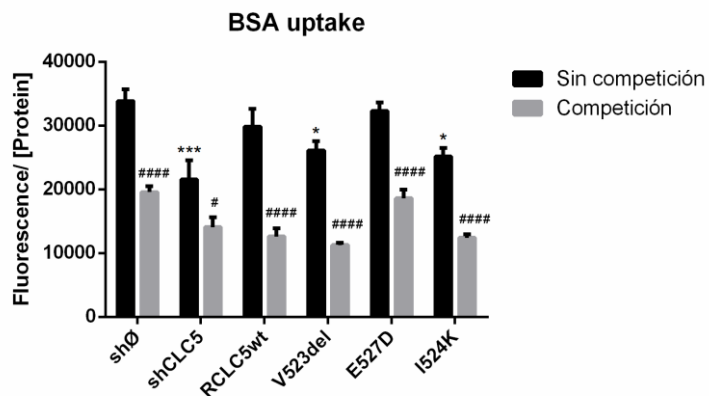


Figura 31. Endocitosis de albúmina en las células RPTEC/TERT. La absorción de albúmina se midió y se cuantificó por un fluorímetro. La albúmina se midió en ausencia (sin competición) o en presencia de albúmina sin marcar (Competición). Los resultados para la condición sin competición se expresaron respecto a la línea shØ. En cambio para el ensayo de competición se expresan respecto a la condición de competición. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (n = 6). Los valores de P (\*P<0.05, # P<0.05).

En general los resultados del ensayo en placa mostraron un limitado rango de diferencias. Para comprobar si este efecto era debido a que el silenciamiento de *CLCN5* o las mutaciones solo producían un efecto parcial sobre la endocitosis, o si, por el contrario, este limitado efecto era debido a

las propias condiciones experimentales, tratamos las células control con Bafilomicina A-1. La Bafilomicina A-1 es un inhibidor de la V-ATPasa, una bomba de protones presente en la membrana de endosomas y principal responsable de acidificar dicho compartimento. Por lo tanto, en presencia de este compuesto la endocitosis mediada por receptor tendría que estar totalmente inhibida. De nuevo, nuestros resultados muestran que el tratamiento con Bafilomicina-A1 únicamente fue capaz de reducir los niveles de albumina488 en no más del 50% (Figura 32). Estos resultados parecen confirmar que en células RPTEC/TERT podrían existir otros mecanismos de entrada de albumina a parte de los sensibles a Bafilomicina-1.

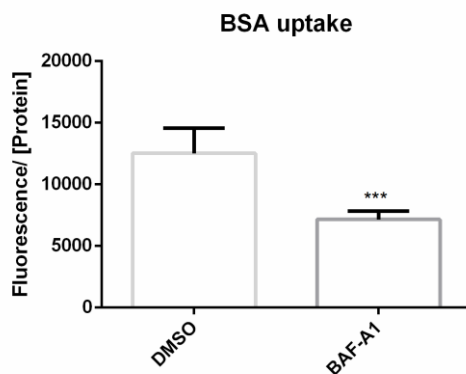


Figura 32. Endocitosis de albúmina en las células RPTEC/TERT en presencia de Bafilomicina-A1. La absorción de albúmina se midió y se cuantificó por un fluorometría La albúmina se midió en ausencia o en presencia del inhibidor de la V-ATPasa. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Los valores de  $P$  (\* $P < 0.05$ ).

#### 4. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN UN MODELOS HK-2

Para validar los resultados obtenidos en el modelo celular RPTEC/TERT, parte de los experimentos se reprodujeron en la línea celular HK-2. Las células HK-2 son una línea celular derivada del túbulo proximal generada hace más de 25 años por Ryan et al<sup>138</sup>. Desde entonces han sido una de las líneas de túbulo proximal de referencia por lo que han sido ampliamente caracterizadas.

En cuanto al silenciamiento de *CLCN5*, y a diferencia de las RPTEC/TERT, para las células HK-2 el shRNA que mostró unamayor silenciamiento de *CLCN5* fue el shRNA3 (Figura 33).

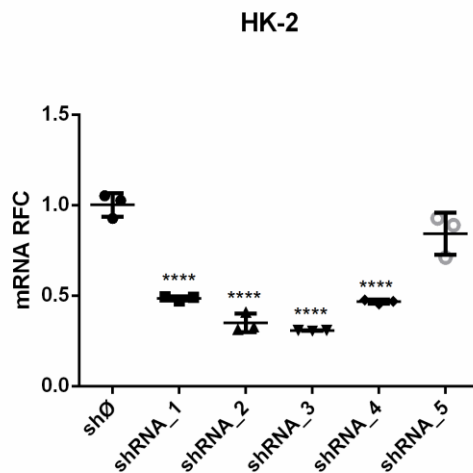


Figura 33. Silenciamiento del gen *CLCN5* endógeno en la línea celular HK-2. RT-qPCR de la expresión del gen *CLCN5* después transducir la línea celular HK-2 con los diferentes shRNA. La línea shØ (transducida con el vector pLKO, vector lentiviral vacío) representa el control negativo de silenciamiento. Las barras de error representan medias de SEM. Comparaciones vs shØ, \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Al igual que para las células RPTEC/TERT, se generaron mutaciones sinónimas en la secuencia diana del shRNA y se introdujeron las mutaciones p.Val523del, p.E527D y p.I524K en el gen del *CLCN5* mediante mutagénesis de sitio-dirigido. La figura 34 muestran los alineamientos de los resultados de secuenciación utilizando como molde el gen *CLCN5* WT, donde los pares de bases en rojo corresponden a la re-introducción de la forma CLC-5 WT, en púrpura a la mutación p.V523del, en verde a las mutación p.E527D y en azul a la mutación p.I524K.

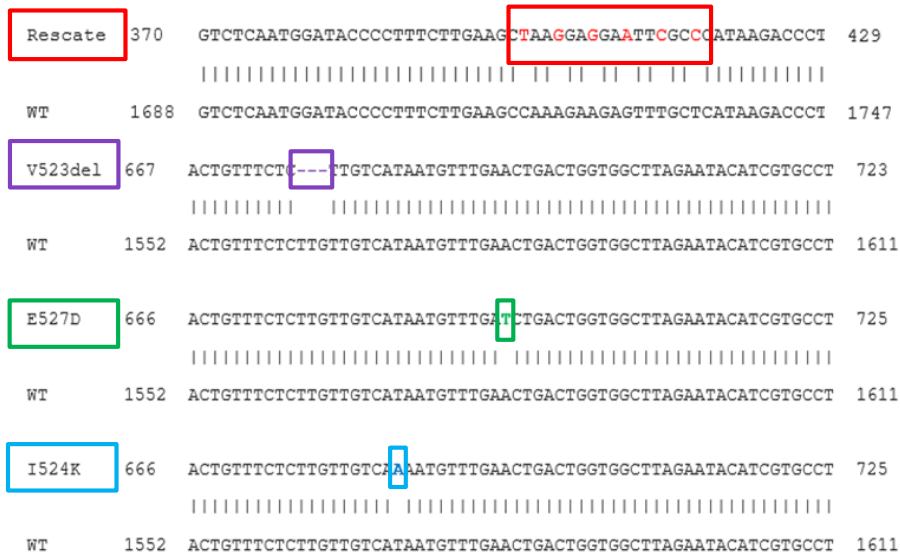


Figura 34. Secuenciación y alineación de los mutantes *CLCN5* en la línea HK-2.

Respecto a los niveles de expresión del *CLCN5* WT y mutado re-introducidos en células previamente silenciadas en *CLCN5*, se observó, utilizando una sonda Taqman contra la parte codificante de *CLCN5*, que tanto la forma WT como las mutaciones p.523del, p.E527D mostraban unos niveles de expresión elevados y similares entre ellos (Figura 35). Por el contrario, la

expresión del mutante p.I524K presentó valores muchos más bajos respecto a las otras formas re-introducidas. Es importante mencionar que, a pesar de que sea difícil de apreciar en el gráfico, los valores de expresión del mutante p.I524K seguían siendo muy superiores a los niveles de expresión del silenciamiento (RQ shCLC5= 0.37 y RQ I524K= 27). De todas formas, esto sugiere que ocurrió algún tipo de problema técnico en la transducción de este mutante.

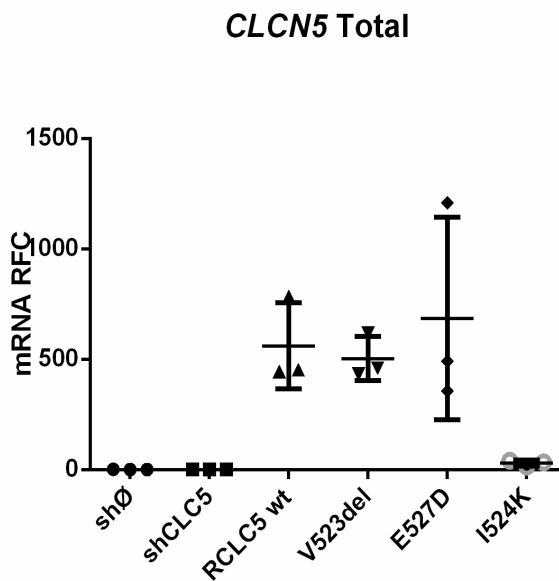


Figura 35. Niveles de expresión en los mutantes CLCN5 en la línea celular HK-2 mediante el uso de técnicas de qRT-PCR. La línea celular, fue transducida con el vector de silenciamiento y de sobreexpresión vacíos, por lo tanto, es la línea control (shØ+Ø). En cambio, la línea shCLC5 fue transducida con el vector lentiviral vacío de sobreexpresión, por lo tanto, representa el silenciamiento de CLCN5 (shCLC5+Ø).

Nuestros resultados también muestran que a pesar de que CLC-5 WT y la mutación V523del y E527D presentaban niveles de mRNA muy parecidos, a nivel proteicos se observó que los niveles de ambas mutantes eran muy



inferiores a los de la forma CLC-5 WT. Es importante recordar que este efecto ya se observó en las células RPTEC (Figura 36) sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación de los niveles de proteína post-traduccionales y post-transcripcionales. Como era de esperar teniendo en cuenta los niveles de mRNA, los niveles proteicos de I524K fueron casi inapreciables en comparación con las otras re-introducidas.

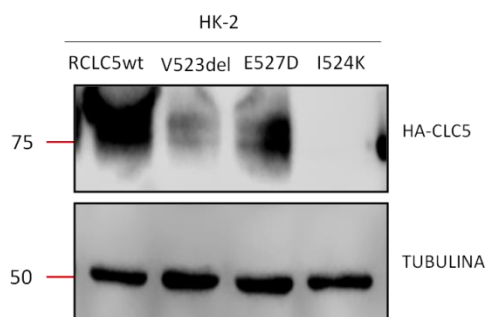


Figura 36. Niveles de expresión de la proteína CLC-5 en los mutantes CLCN5 en la línea celular HK-2.

Tal y como muestra la figura 37, el silenciamiento de *CLCN5* provocó una clara disminución en los niveles de captación de albúmina respecto a la línea control. De igual modo que en la línea celular RPTEC, la re-introducción de CLC-WT provocó una recuperación en los niveles de captación de albúmina. Demostrando que la disminución del silenciamiento no era debida a efectos “off target”. A diferencia de la re-introducción de la forma CLC-5, no se observó la recuperación de la capacidad endocítica en ninguna de las formas mutantes estudiadas, confirmando que estas mutaciones alteraban de forma considerable la capacidad endocítica. En cuanto a la mutante p.I524K, aunque los niveles de de mRNA fueron superiores al silenciamiento, no podemos afirmar que el defecto en la capacidad endocítica observado sea debida a la mutación.

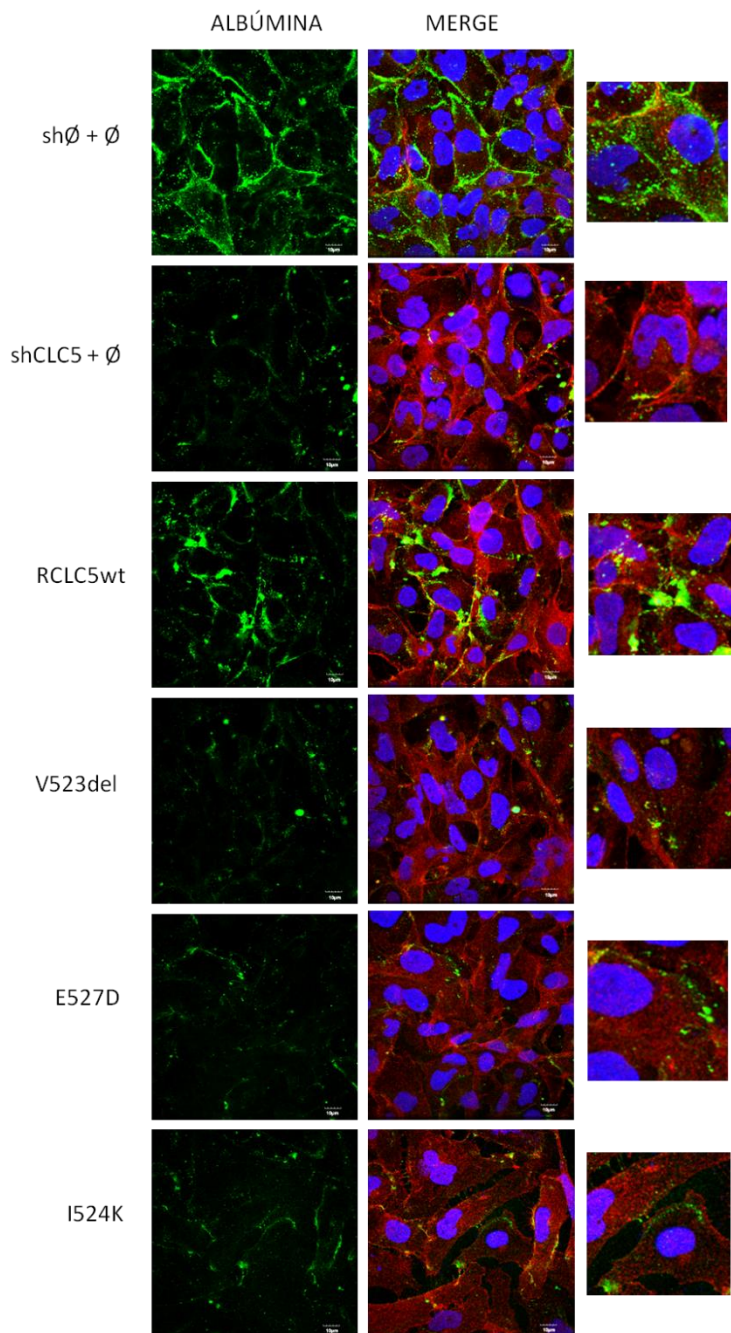


Figura 37. Efecto de las mutaciones y del silenciamiento de CLCN5 en la captación de albúmina en las líneas celulares HK-2. Internalización de la albúmina (Verde) después de la exposición con albúmina marcada fluorescentemente durante 60 minutos en las líneas celulares RPTEC/TERT. Para demostrar que la albúmina se encontraba dentro de la superficie celular, se realizó una contra-tinción con el anticuerpo N-Cadherina para delimitar el perímetro celular. Barra de escala= 10 $\mu$ m.

## 5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN *CLCN5* A TRAVÉS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Con el objetivo de estudiar el impacto producido por el silenciamiento de *CLCN5* o la reintroducción de las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K, en las correspondientes líneas celulares nos propusimos analizar los niveles de expresión génica mediante el análisis de microarrays de mRNA. Esto nos permitiría identificar aquellos genes cuya expresión génica pudiera estar regulada diferencialmente por el silenciamiento de *CLCN5* o la presencia de las mutaciones estudiadas.

El análisis de la expresión génica se realizó en muestras cultivadas durante 10 días. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por condición obtenidas en días independientes y se analizaron mediante una matriz Clariom D que cubre más de 20.000 genes conocidos.

### 5.1 Análisis de calidad de los datos obtenidos del microarray

En este análisis, se han realizado diferentes tipos de controles de calidad (QC). Es importante hacer este tipo de verificaciones antes y después de la normalización del microarray para verificar que todas las muestras son adecuadas para el proceso de normalización, y verificar si los datos normalizados son apropiados para el análisis de expresión diferencial. En la figura 38 se muestra el análisis de componentes principales (PCA, del inglés principal component analysis) para los microarrays.

Principal Component Analysis for: Normalized data batch-corrected. Group

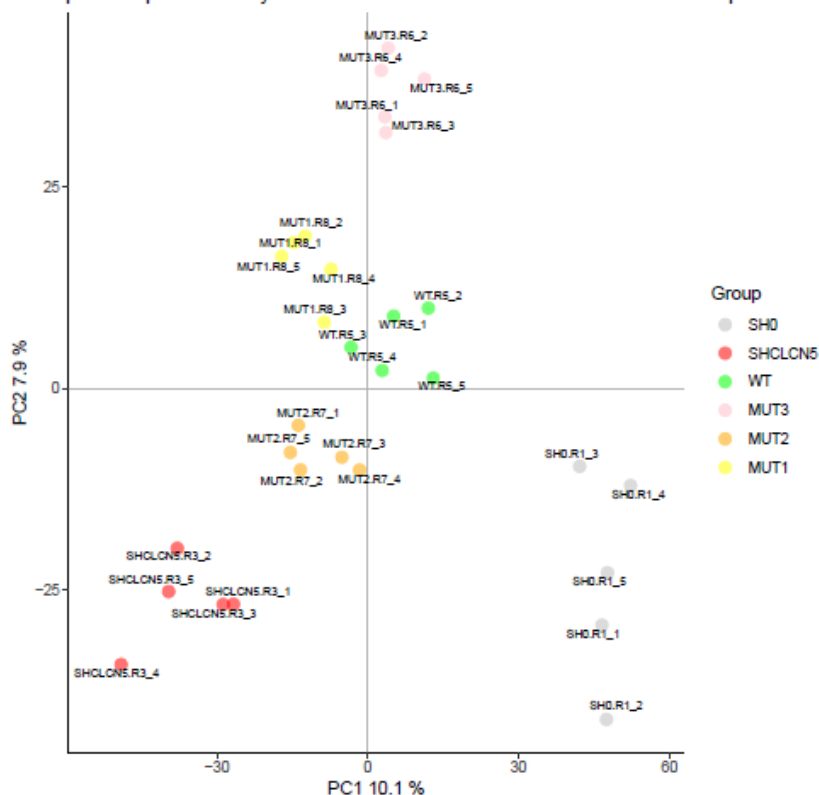


Figura 38. Análisis de componentes principales (PCA) para datos una vez normalizados y corregidos por el efecto "batch" que muestran la agrupación de muestras según su grupo.

El análisis de componentes principales es una técnica de reducción de dimensiones que se puede usar para representar los valores de un microarray de expresión en dos (o tres) dimensiones. El gráfico se construye de tal manera que muestras "similares" deben aparecer juntas en el gráfico, de modo que, si una muestra aparece cerca de otras que no se consideran similares, se puede sospechar la presencia de algún tipo de problema técnico, como efectos "batch", etiquetado incorrecto de muestras, etc.

Nuestros resultados muestran que los datos de los arrays, una vez normalizados y corregidos por el efecto "batch", se agruparon principalmente

por condición experimental, es decir, por la presencia de silenciamiento de *CLCN5* o el tipo de mutación re-introducido. Esto confirma que los datos son apropiados para el posterior análisis comparativo.

A continuación, se aplicó un filtrado de datos para aumentar el poder estadístico y reducir el ruido innecesario, de manera que aquellos genes que no se podían considerar expresados o diferencialmente expresados fueron eliminados. En la figura 39 todos aquellos genes cuya desviación estándar estaban por debajo del percentil 65 de todas las desviaciones estándar, fueron eliminados. Después de aplicar todos estos filtros, el número total de genes incluidos en este análisis de expresión génica fue 8482 genes.

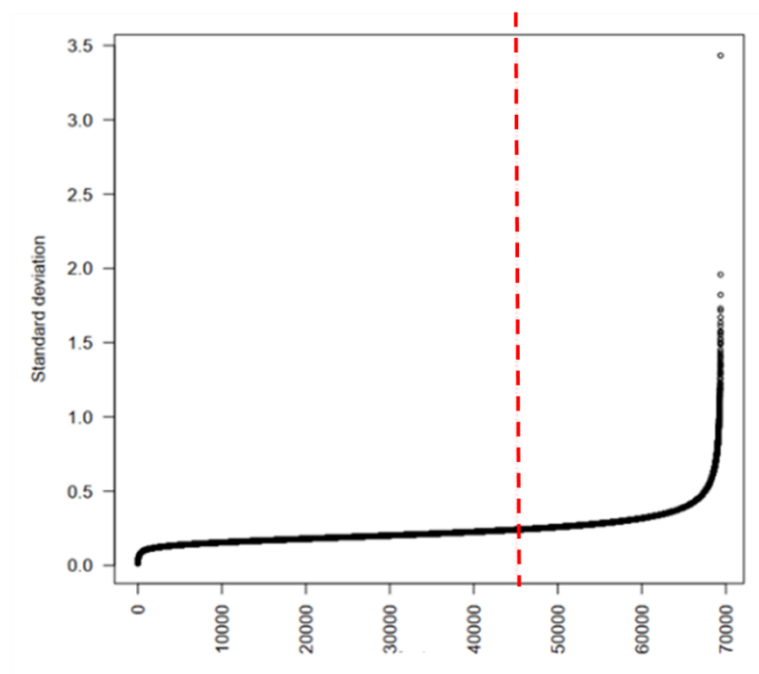


Figura 39. Desviaciones estándar de todos los genes del microarray. La línea roja indica el límite correspondiente a aquellos genes que estaban por debajo del percentil 65.

Finalmente, y a modo de control interno, decidimos analizar los niveles relativos de *CLCN5*. Para ello, se compararon los niveles de expresión de *CLCN5* obtenidos en el microarray en las diferentes líneas celulares con los niveles de la línea control. A modo de recordatorio, en la tabla 22 se muestran las características de cada línea celular.

Tabla 22. Características de las líneas celulares generadas. El símbolo  $\emptyset$  corresponde al vector vacío y shCLC5 corresponde al vector de silenciamiento. El vector de expresión puede contener la forma CLC5 WT o las mutaciones V523del, E527D o I524K.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Vector silenciamiento</b>	<b>Vector expresión</b>	<b>Presencia CLCN5 endógeno</b>	<b>Presencia CLCN5 Exógeno</b>
<b>sh<math>\emptyset</math></b>	$\emptyset$	$\emptyset$	SI	NO
<b>shCLC5</b>	shCLC5	$\emptyset$	NO	NO
<b>RCLC5 WT</b>	shCLC5	CLC5 WT	NO	SI
<b>V523del</b>	shCLC5	V523del	NO	SI
<b>E527D</b>	shCLC5	E527D	NO	SI
<b>I524K</b>	shCLC5	I524K	NO	SI

Como se muestra en la tabla 23, los resultados del microarray confirmaron que el silenciamiento de *CLCN5* provocó una potente disminución de los niveles de expresión de dicho gen (comparación 1). De igual forma, la re-introducción de CLC5 WT (comparación 2) o mutado (comparaciones 3-5) indujo niveles muy elevados de *CLCN5* respecto a la línea control. Es interesante mencionar que, a diferencia de lo obtenido en las qPCR realizadas anteriormente (ver figura 22), los valores de log FC (“fold change”) observados en las comparaciones 2,3, 4 y 5 fueron muy similares entre ellos, sugiriendo que las líneas expresan valores similares de *CLCN5*.

Tabla 23. Valores de logFC de CLCN5

Comparación	Niveles de expresión de CLCN5	
	logFC	adj.P.Val
1) shCLC5 vs shØ	-1,226950162	1,03546E-06
2) RCLC5wt vs shØ	6,81148353	1,9706E-22
3) V523del vs shØ	6,56526584	5,3868E-22
4) E527D vs shØ	6,5104975	6,7706E-22
5) I524K vs shØ	6,02798461	5,5206E-21

## 5.2 Descripción general del microarray

En esta tesis, se ha aplicado un criterio arbitrario para considerar si un gen estaba diferencialmente expresado o no en cada una de las comparaciones. Para ello hemos establecido que un gen debe presentar un valor absoluto de logFC superior a 0.5 y un p valor ajustado menor de 0.05 para considerarse diferencialmente expresado.

### 5.2.1 Efecto del silenciamiento y la re-introducción del CLC5 WT en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT.

En base a estos criterios, en la tabla 24, se muestran el número de genes diferencialmente expresados debidos al efecto del silenciamiento de CLCN5 y la re-introducción del RCLC5 WT en una línea previamente silenciada para CLCN5. Como se puede observar en la tabla el número de genes up y down regulado para cada comparación es similar.

Tabla 24. Impacto del silenciamiento y en la re-introducción del gen *CLCN5* (*p* valor ajustado <0.05, valor absoluto de *logFC* > 0.5)

Comparación	Genes up-regulados	Genes down-regulados	Total
shCLC5 vs shØ	810	773	1563
WT vs shCLC5	246	225	471

Es interesante destacar que la expresión de 380 genes se modificó, tanto por el silenciamiento de *CLCN5* como la re-introducción de la forma WT en las células previamente silenciadas (Figura 40). Es más, la expresión de todos estos genes comunes se modificó en sentido opuesto en cada condición, es decir, que para un determinado gen, si su expresión se encontraba up regulada por el silenciamiento de *CLCN5*, al re-introducir el RCLC5 WT su expresión disminuía, y viceversa.

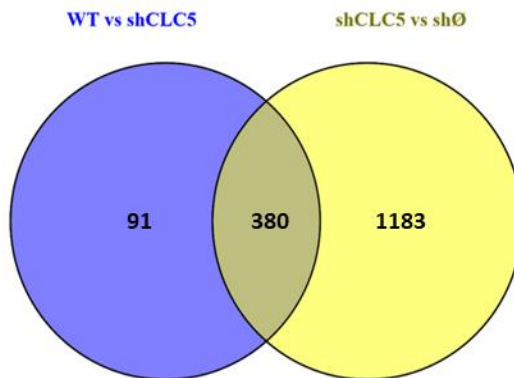


Figura 40. Diagrama de Venn de las comparaciones múltiples entre WT vs shCLC5 y shCLC5 vs shØ. Los genes up y down regulados se analizaron de forma conjunta. Los genes que se encuentran en la intersección corresponden a los genes comunes, mientras que los genes que se encuentra fuera de la intersección corresponden a genes específicos de cada comparación. Adj.P.Value<0.05 y un valor absoluto de *logFC* > 0.5.



### 5.2.2 Efecto de la re-introducción de formas mutadas del CLC5 WT en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT.

En tabla 25 se indican el número de genes cuya expresión se ve modificada por el efecto de cada una de las mutaciones respecto a la forma wild-type.

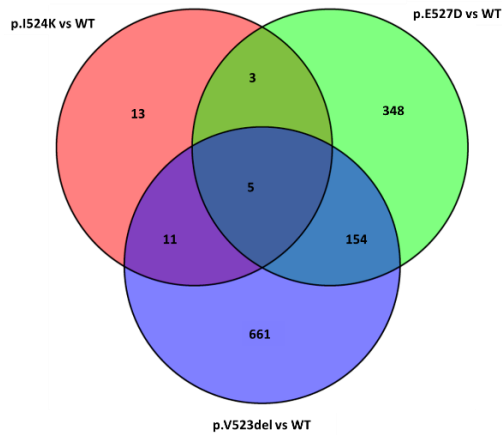
*Tabla 25. Impacto de las mutaciones en la expresión génica. Genes diferencialmente expresados en las comparaciones descritas. (p valor ajustado <0.05, valor absoluto de logFC> 0.5)*

Comparación	Genes up-regulados	Genes down-regulados	Total
<b>V523del vs RCLC5wt</b>	601	230	831
<b>E527D vs RCLC5wt</b>	306	204	510
<b>I524K vs RCLC5wt</b>	26	6	32

Es interesante destacar que la mutación V523del es la mutación que provocó el mayor cambio en el número de genes respecto al RCLC5 WT. Por el contrario, la mutación I524K fue la condición en la que un menor número de genes se vio modificado. Esto indica que las mutaciones V523del y E527 presentan un patrón de expresión más diferente que la forma WT, mientras que la mutación pI524K presentó un patrón más parecido a la forma wild-type. Este último hecho resulta un poco inexplicable teniendo en cuenta que I524K está catalogada como una mutación de tipo 1 y, por tanto, quedaría retenida en el retículo endoplasmático.

Un análisis de los genes modificados en cada condición constato que solo cinco genes variaban su expresión debido a todas las mutaciones, teniendo en cuenta los criterios descritos anteriormente (Figura 41). Este resultado es inesperado ya que cabría esperar que un mayor número de genes viera su expresión alterada de forma común. De igual forma, 661 genes se vieron afectados solo por la mutación V523del y 348 se vieron afectados solo por la mutación E527D. Estos resultados parecen indicar que el efecto de cada

una de estas mutaciones es muy específico y que en algunos casos podría atribuirse a una ganancia de función respecto a la ausencia de proteína.



*Figura 41. Diagrama de Venn de las comparaciones múltiples entre p.V523del vs WT, p.E527D vs WT e p.I524K vs WT. Los genes regulados al alza y a la baja se analizaron de forma conjunta. Los genes que se encuentran en la intersección corresponden a los genes comunes, mientras que los genes que se encuentran fuera de la intersección corresponden a genes específicos de cada comparación. Adj.P.Value<0.05 y un valor absoluto de logFC> 0.5.*

### 5.3 Validación de los resultados del microarray

Para corroborar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el microarray, se decidió validar la expresión de algunos genes mediante una técnica alternativa. Se decidió validar aquellos genes cuya expresión se vio alterada en mayor grado (con mayor logFC absoluto) por alguna de las mutaciones y se analizaron sus niveles de mRNA mediante PCR cuantitativa (qPCR) con sondas Taqman comerciales. Estos genes se seleccionaron, cuando fue posible, en función de los siguientes criterios, ordenados de forma jerárquica:

1. Genes cuya expresión se vio modificada por alguna de las mutaciones respecto a la condición WT. A poder ser, que la expresión de estos genes solo se viera alterada por una de las mutaciones.

2. Entre los genes del apartado anterior, se seleccionaron aquellos genes cuya expresión se había visto modificada por el silenciamiento de *CLCN5*.

3. Entre los genes del apartado anterior, se seleccionaron aquellos genes cuya expresión se restableció total o parcialmente al re-introducir el *CLC-5 WT*.

Teniendo en cuenta los anteriores puntos, se eligieron los siguientes genes:

Tabla 26. Valores *logFC* de algunos genes obtenidos en el Microarray para cada una de las comparaciones indicadas.

	V523del vs RCLC5wt	E527D vs RCLC5wt	I524K vs RCLC5wt	shCLC5 vs shØ	RCLC5wt Vs shCLC5
	<i>logFC</i>	<i>logFC</i>	<i>logFC</i>	<i>logFC</i>	<i>logFC</i>
STEAP1	-0,227	-0,238	0,753	-0,955	0,173
ZPLD1	-0,808	2,248	0,079	2,430	-1,687
PTPRD	1,550	-0,372	-0,290	-4,775	4,076
CDH1	-2,270	0,372	-1,104	-3,698	2,466
EMX2	0,117	-1,552	0,139	-2,985	2,109
NR1H4	2,592	-1,287	0,185	-2,841	0,985
EHF	-1,579	-0,415	-0,074	-4,106	3,279

En la tabla 26 se muestran los valores de *logFC* obtenidos en el microarray para cada una de las comparaciones indicadas. Resaltado en verde (para los genes up-regulados) o rojo (para los genes down-regulados) se indica la condición específica por la cual se eligió cada uno de los genes. A continuación, se analizó los niveles de expresión de estos genes mediante qPCR (Figura 42).

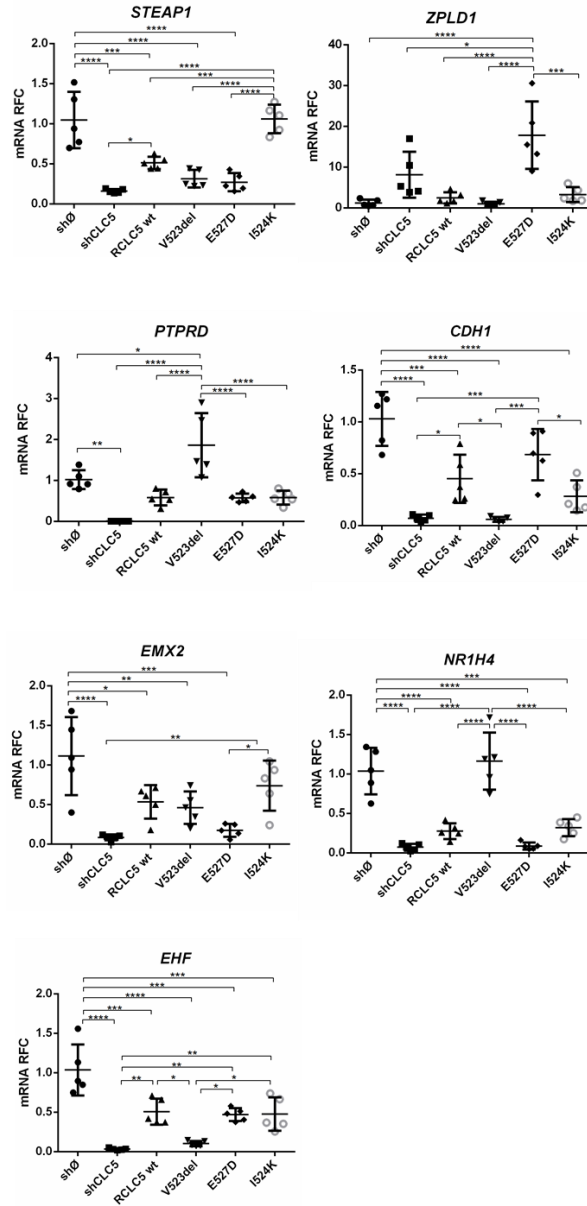


Figura 42. Validación de los resultados de microarrays en la línea celular RPTEC/TERT por RT-qPCR. Expresión relativa de los genes STEAP1, ZPLD1, PTPRD, CDH1, EMX2, NR1H4 y EHF. El patrón de expresión de los genes seleccionados concuerda con la expresión génica diferencial encontrada en los microarrays. La expresión génica fue normalizada respecto a la muestra shØ. Las barras de error representan las medias de SEM. STEAP1 (\* $p < 0.04$ , \*\*\* $p < 0.0007$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), ZPLD1 (\* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.0007$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), PTPRD (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.016$ , \*\*\* $p < 0.0016$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), CDH1 (\* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.0007$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), EMX2 (\* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.009$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), NR1H4 (\*\*\* $p < 0.00016$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), EHF (\* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.032$ , \*\*\* $p < 0.0009$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## 5.4 Genes modulados por el silenciamiento de *CLCN5*

El perfil de expresión génica de las células RPTEC/TERT silenciadas por *CLCN5* se representó gráficamente mediante Heatmaps (Figura 43). Un Heatmap o mapa de calor es una representación gráfica de datos donde los valores individuales contenidos en una matriz se representan utilizando una escala de color que va de valores bajos de expresión (azul) hasta valores altos (rojos). En esta matriz las filas indican un determinado gen y las columnas una determinada condición experimental. Los genes que muestran un perfil similar entre condiciones son agrupados en clusters, proporcionando una idea de los grupos de genes que pueden estar simultáneamente sobre o infraexpresados en cada condición.

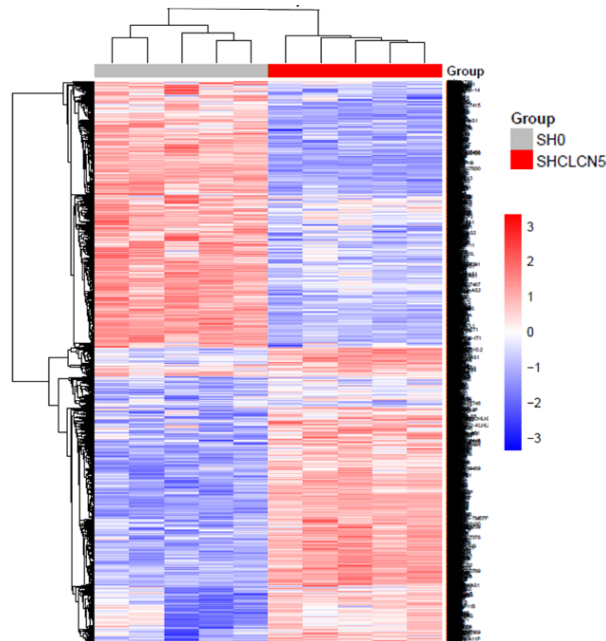


Figura 43. Representación de perfiles de expresión génica para las condiciones control y silenciamiento de *CLCN5* mediante Heatmaps. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto  $\log_{FC} > 0.5$ .

El Heatmap para las condiciones control y silenciamiento para *CLCN5* muestra un patrón de expresión génica claramente diferencial. En la tabla 27 se

muestran los 30 genes más up o down-regulados de los 1563 genes cuya expresión se había visto afectada por el silenciamiento de CLC-5. Es interesante mencionar que tanto en el Heatmap como en la tabla de valores se observaron valores de cambio muy elevados, es decir valores de logFC absolutos muy elevados. Este resultado significa que el silenciamiento de *CLCN5* tiene una importante repercusión en las células RPTEC/TERT. La potencial relevancia de algunos de los genes presentes en la tabla 27 relacionados con la patología renal se discute en la sección de Discusión.

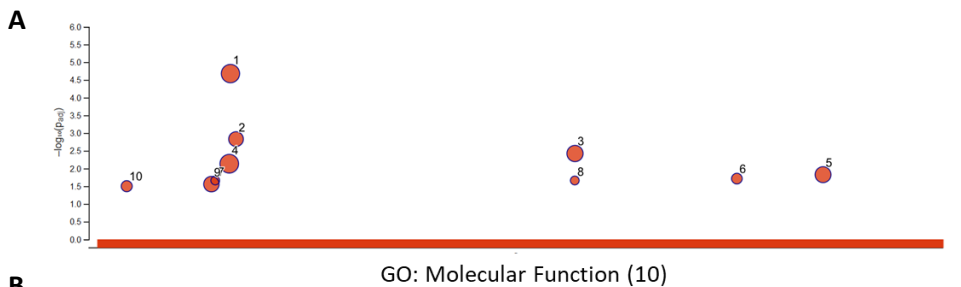
Tabla 27. Los 30 genes diferencialmente expresados en la comparación *shCLC5* vs *shØ*.  
Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

<b>Up-regulados</b>			<b>Down-Regulados</b>		
<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>
SLC14A1	5,08104134	4,7911E-14	SLPI	-5,0122587	7,2587E-18
TTC29	3,67920662	1,147E-12	PTPRD	-4,7746604	5,7326E-18
TMEM178A	3,35074031	3,7906E-16	MUC1	-4,7256363	1,6325E-20
ACSM3	3,04935039	3,8909E-14	SOSTDC1	-4,1670529	4,7093E-14
DIRAS2	3,01463552	3,9293E-15	EHF	-4,1057469	4,9353E-19
RAB3B	2,96912762	7,2587E-18	SLC34A2	-4,0120807	3,349E-16
LINC01508	2,87116879	5,1124E-11	ARHGEF38	-3,7971367	7,1444E-15
ADAMTS16	2,85634025	2,2677E-10	LIX1	-3,7193965	9,1177E-14
ITGA11	2,82093839	1,5451E-14	CDH1	-3,697591	7,1444E-15
KIT	2,78414573	5,3705E-11	PTH1R	-3,6076547	1,0662E-13
NTM	2,76669702	4,9702E-13	CXCL6	-3,5471001	5,6308E-12
FAM189A1	2,61713834	2,2487E-15	ANPEP	-3,4977124	2,5794E-14
SLC16A10	2,54195034	3,9823E-11	C3	-3,4319606	7,1444E-15
ST8SIA2	2,44775401	7,325E-14	PTGFR	-3,3390622	4,3687E-13
PGM5	2,44469443	1,81E-13	CDH3	-3,3137168	5,7326E-18

Para dar un sentido biológico a los perfiles de expresión observados, es decir, para determinar si el conjunto de los cambios de expresión génica producidos por el silenciamiento de *CLCN5* reflejaban, de forma conjunta, cambios en procesos biológicos en las correspondientes células, se utilizó la herramienta “G profiler” (ver Materiales y Métodos). G profiler permite

detectar, para una lista de genes dada, términos GO de cada una de las categorías (función molecular, proceso biológico o compartimento celular) enriquecidos de manera estadísticamente significativa.

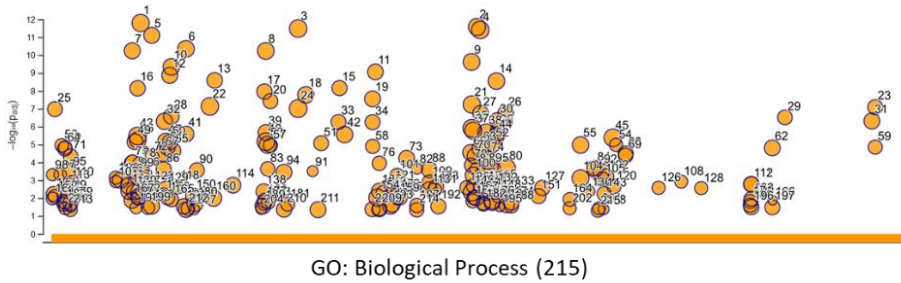
El análisis de la significancia biológica de los 1563 genes diferencialmente expresados en la comparación shCLC5 vs shØ mostró que 10 funciones moleculares (Figura 44), 244 procesos biológicos (Figura 45) y 24 términos referentes a componentes celulares (Figura 46) se veían significativamente sobre-representados. Para cada figura se muestra en la parte superior una representación de todos los términos GO encontrados significativamente sobre-representados y en la parte inferior una tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación.



ID	Term Name. Cellular component	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	binding	GO:0005488	0,00733634	1213
2	protein binding	GO:0005515	2,09701E-05	1017
3	anion binding	GO:0043168	0,00377995	264
4	carbohydrate derivative binding	GO:0097367	0,01492820	214
5	signaling receptor binding	GO:0005102	0,0276535	160
6	cytoskeletal protein binding	GO:0008092	0,00148273	111
7	DNA helicase activity	GO:0003678	0,03159893	16
8	extracellular matrix binding	GO:0050840	0,01930802	14
9	platelet-derived growth factor receptor binding	GO:0005161	0,02179012	7
10	3'-5' DNA helicase activity	GO:0043138	0,02179012	7

Figura 44. Funciones Moleculares encontrados en la comparación shCLC5 vs shØ. A) Gráficas de puntos de las Funciones Moleculares (MF). B) Tabla resumen de los 10 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

**A**



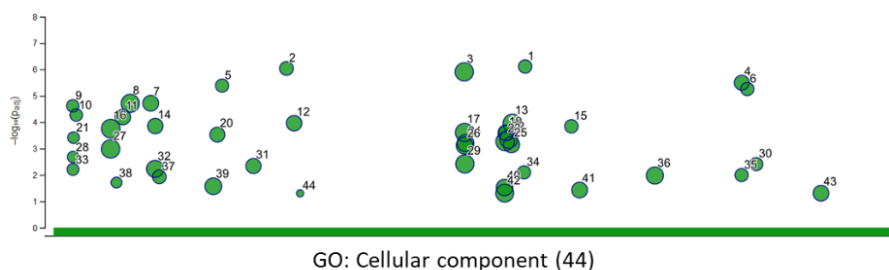
**B**

ID	Term Name. Cellular component	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	cellular component organization	GO:0016043	7,37E+07	586
2	cell differentiation	GO:0030154	0.00001046	403
3	regulation of signaling	GO:0023051	5,89E+04	378
4	regulation of cell communication	GO:0010646	4,54E+04	375
5	regulation of localization	GO:0032879	1,70E+08	304
6	movement of cell or subcellular component	GO:0006928	5,77E+05	256
7	cell population proliferation	GO:0008283	7,90E+03	244
8	locomotion	GO:0040011	2,82E+08	224
9	regulation of cellular component movement	GO:0051270	4,40E+08	207
10	localization of cell	GO:0051674	1,82E+09	200
11	cell motility	GO:0048870	1,82E+09	200
12	positive regulation of signal transduction	GO:0009967	2,66E+08	196
13	cell adhesion	GO:0007155	7,21E+06	175
14	biological adhesion	GO:0022610	1,10E+08	175
15	tube development	GO:0035295	7,02E+06	147
16	regulation of locomotion	GO:0040012	5,65E+08	137
17	regulation of cell motility	GO:2000145	8,19E+07	133
18	regulation of cell migration	GO:0030334	3,79E+07	128
19	tube morphogenesis	GO:0035239	5,47E+07	122
20	response to lipid	GO:0033993	0.00000854	119

Figura 45. Procesos biológicos encontrados en la comparación *shCLC5* vs *shØ*. A) Gráficas de puntos de los Procesos Biológicos (BP). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto  $\log_{10}FC > 0.5$



**A**



**B**

ID	Term Name. Cellular component	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	cell part	GO:0044464	0,000111281	1276
2	cell	GO:0005623	0,000175805	1276
3	organelle	GO:0043226	1,23E-06	1073
4	membrane-bounded organelle	GO:0043227	0,000244605	982
5	cytoplasm	GO:0005737	1,93E-05	927
6	cytoskeleton	GO:0005856	1,92E-05	224
7	chromosome	GO:0005694	6,37E-05	181
8	intrinsic component of plasma membrane	GO:0031226	0,000109372	180
9	cytoskeletal part	GO:0044430	0,000254879	175
10	integral component of plasma membrane	GO:0005887	0,000140327	173
11	chromosomal part	GO:0044427	0,000250141	168
12	plasma membrane region	GO:0098590	3,19E-06	139
13	microtubule cytoskeleton	GO:0015630	0,000296788	132
14	extracellular matrix	GO:0031012	9,15E-07	77
15	apical part of cell	GO:0045177	7,74E-07	63
16	collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	0,000143421	58
17	chromosomal region	GO:0098687	5,52E-06	56
18	apical plasma membrane	GO:0016324	4,10E-06	54
19	chromosome, centromeric region	GO:0000775	2,41E-05	39
20	condensed chromosome	GO:0000793	5,34E-05	37

Figura 46. Componentes celulares encontrados en la comparación shCLC5 vs shØ. A) Gráficas de puntos de los Componentes celulares (CC). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

Es interesante destacar, que, en muchos casos, estos términos hacían referencia a funciones o procesos que podrían estar relacionados con la enfermedad de Dent. Entre estos encontramos, por ejemplo, funciones

moleculares como la unión a proteínas, la unión a aniones o la unión a receptores de señalización, o procesos biológicos tales como la diferenciación celular o la regulación de la comunicación celular. La posible relación de estos términos con la enfermedad de Dent se discute en mayor profundidad en la sección de Discusión.

### 5.5 Impacto de la re-introducción del CLC5 WT en células previamente silenciadas

Como se comentó en la sección de descripción general del microarray, la re-introducción de RCLC5 WT en una línea previamente silenciada para *CLCN5* provocó la modificación de la expresión de 471 genes. De estos 471 genes, 380 habían sido previamente modificados por el silenciamiento de *CLCN5* pero en sentido opuesto. Cabe destacar que esta reversión en la expresión génica se observó para todos los genes que tras el silenciamiento de *clc5* presentaban valores elevados de logFC.

En las tablas 28 y 29 se muestran los genes comúnmente modulados tanto por el silenciamiento de *CLCN5* como por la re-introducción de la forma WT en células previamente silenciadas. Las tablas se han ordenado en función de los genes más up o down regulados en la comparación shCLC5 vs shØ (control). Como acabamos de mencionar, la expresión de todos estos genes comunes se modificó en sentido opuesto en cada comparación, como por ejemplo, la expresión del gen *SLC14A1* se encontraba up regulada por el silenciamiento de *CLCN5*, en cambio, al re-introducir el RCLC5 WT su expresión disminuía.

Tabla 28. Los 15 genes diferencialmente expresados en las comparaciones WT vs shCLC5 y shCLC5 vs shØ. Adj.P.Value < 0.05 y logFC>0.5

<b>Genes up-regulados</b>				
<b>Para la comparación shCLC5 vs shØ</b>				
<b>GeneSymbol</b>	<b>logFC shCLC5 vs shØ</b>	<b>adjPval shCLC5 vs shØ</b>	<b>logFC Wt vs shCLC5</b>	<b>adjPval. Wt vs shCLC5</b>
<b>SLC14A1</b>	5,08104134	4,79114E-14	-3,977038387	4,18868E-11
<b>TTC29</b>	3,679206623	1,14704E-12	-1,067780535	0,002680413
<b>TMEM178A</b>	3,350740312	3,79059E-16	-2,614100467	2,12546E-13
<b>ACSM3</b>	3,04935039	3,89094E-14	-3,482219987	7,56065E-15
<b>DIRAS2</b>	3,014635521	3,92929E-15	-1,807712049	6,97955E-10
<b>RAB3B</b>	2,969127618	7,25872E-18	-1,363054288	6,97955E-10
<b>LINC01508</b>	2,871168794	5,11238E-11	-1,560351427	1,15104E-05
<b>ADAMTS16</b>	2,856340255	2,26768E-10	-2,292388697	6,32122E-08
<b>ITGA11</b>	2,820938391	1,54507E-14	-2,796221655	5,08676E-14
<b>KIT</b>	2,784145733	5,37046E-11	-1,970813304	1,67632E-07
<b>NTM</b>	2,766697018	4,97022E-13	-1,45799613	5,89012E-07
<b>FAM189A1</b>	2,617138339	2,24867E-15	-1,498680451	1,08268E-09
<b>SLC16A10</b>	2,541950339	3,98234E-11	-1,243742469	4,16723E-05
<b>ST8SIA2</b>	2,44775401	7,32502E-14	-1,116925328	1,39984E-06
<b>PGM5</b>	2,44469443	1,80999E-13	-1,476028667	2,36354E-08

Tabla 29. Los 15 genes diferencialmente expresados en las comparaciones WT vs shCLC5 y shCLC5 vs shØ. Adj.P.Value < 0.05 y logFC>0.5

<b>Genes down-regulados</b>				
<b>Para la comparación shCLC5 vs shØ</b>				
<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b> <i>shCLC5 vs shØ</i>	<b>adjPval</b> <i>shCLC5 vs shØ</i>	<b>logFC</b> <i>Wt vs shCLC5</i>	<b>adjPval.</b> <i>Wt vs shCLC5</i>
SLPI	-5,012258677	7,25872E-18	2,490688757	1,48614E-10
PTPRD	-4,774660354	5,73261E-18	4,076780087	4,04796E-16
MUC1	-4,725636323	1,63254E-20	2,641888478	1,76224E-14
SOSTDC1	-4,167052862	4,70927E-14	1,301344707	0,000249537
EHF	-4,10574689	4,93531E-19	3,279045767	2,02258E-16
SLC34A2	-4,012080704	3,34897E-16	3,063994515	2,63198E-13
CDH1	-3,697591042	7,14438E-15	2,466205116	1,48614E-10
CXCL6	-3,547100112	5,63081E-12	2,069829383	7,08157E-07
ANPEP	-3,497712417	2,57939E-14	3,384013567	1,46952E-13
C3	-3,431960618	7,14438E-15	1,977200085	3,2444E-09
LOC101927630	-3,312773819	3,67966E-14	1,846828299	2,36354E-08
DPP4	-3,30097477	1,0374E-17	2,391987241	4,87344E-14
MAOA	-3,287033568	1,28465E-14	1,55734935	1,80241E-07
KRT7	-3,191449694	1,43739E-14	1,843985356	5,77037E-09
EMP1	-3,03942192	4,08616E-14	1,579039068	9,30668E-08
EMX2	-2,985473141	7,14438E-15	2,109958064	4,91996E-11
TFAP2B	-2,829781925	4,26934E-10	1,487260207	8,54455E-05
SLC16A4	-2,76795166	1,07292E-09	1,268566407	0,000787191
PAX6	-2,729512406	1,61047E-10	2,062822162	1,35978E-07
GPNMB	-2,714682697	1,34571E-15	2,462748029	2,82462E-14
SLCO2B1	-2,69520211	5,63081E-12	2,977563405	2,36378E-12

Por lo tanto, este resultado nos demuestra que, la re-introducción de RCLC5WT revierte parcialmente el efecto del silenciamiento a nivel de la expresión génica. Además, estos experimentos de rescate de la expresión de CLC-5 demuestran que el efecto en la expresión genica inducido por el silenciamiento de CLC-5 era específico y no debido a efectos “off-targets”.

## 5.6 Impacto en la expresión genica de la re-introducción de formas mutantes de clc5 en células previamente silenciadas para clc5

El perfil de expresión génica de las células RPTEC/TERT silenciadas por CLC-5 donde se había re-introducido las formas mutadas de CLC-5 p.V523del, p. E527D y p.I524K se representó gráficamente mediante Heatmap (Figura 47).

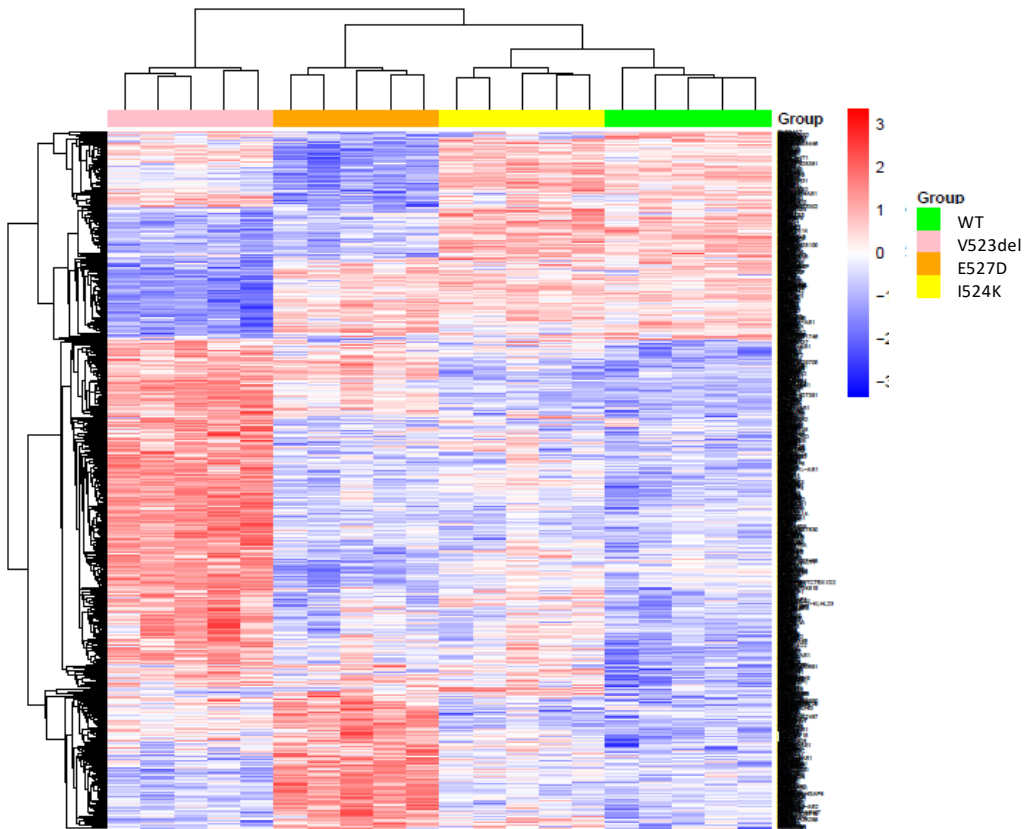


Figura 47. Representación de perfiles de expresión génica de la comparación p.V523del vs WT, p.E527D s WT, p.I524K vs WT mediante Heatmaps.. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto de logFC>0.5

Además de las diferencias que se pueden observar directamente en el patrón de colores del heatmap, en la parte superior del heatmap se muestra un clustering jerárquico donde las diferentes muestras se agrupan en función de las similitudes en su perfil de expresión. Nuestros resultados muestran claramente que la mutación p.V523del es la condición que presenta un patrón de expresión con mayores diferencias respecto a la forma WT. Por el contrario, la re-introducción del mutante p.I524K es la condición que presentó un patrón de expresión más similar a la condición wild-type. Estos resultados obtenidos con la mutación p.I524K resultan sorprendentes teniendo en cuenta que la mutación I524K está clasificada como mutación de tipo 1, un tipo mutación que provoca que la proteína CLC5 quede retenida en el retículo endoplasmático y no pueda ejercer su función en el endosoma. Por lo que respecta a la mutación p.E527D también se observaron marcados cambios en el perfil de expresión génica respecto a las condiciones *CLCN5* WT e I524K. En resumen, nuestros resultados indican que las mutaciones V523del y E527 produjeron los mayores cambios en el perfil de expresión respecto a la forma WT.

### 5.7 Impacto de la mutación p.V523del en el perfil de expresión génica de células RPTEC/TERT

Para identificar los genes modulados por la mutación p.V523del, comparamos los niveles de expresión génica entre la mutación p.V523del respecto a los obtenidos en la forma WT. Como se mencionó en la sección de descripción general del microarray y con los criterios arbitrarios escogidos, la re-introducción de la mutación p.V523del en una línea previamente silenciada para *CLCN5* provocó una modificación en la expresión de 843 genes, de los cuales 607 estaban up-regulados y 236 down-regulados. Los 30 genes más up o down-regulados se muestran en la tabla 30. Es importante resaltar que tanto en la tabla de valores como en el Heatmap se observaron valores de log FC absolutos elevados. Estos resultados indican que la mutación p.V523del

produce un gran impacto en las células del túbulo proximal (RPTEC/TERT). Es interesante mencionar que, algunos de los cambios en la expresión génica inducidos por este mutante podrían ser resultado de una ganancia de función de la proteína mutada respecto a la ausencia de esta.

Tabla 30. Los 30 genes diferencialmente expresados en la comparación del mutante p.V523del vs RCLC5wt. Adj.P.Value < 0.05 y logFC>0.5.

<b>Up-regulados</b>			<b>Down-regulados</b>		
<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>
SLC17A1	3,049354965	7,57395E-09	CDH1	-2,2699238	2,1101E-09
SLC17A3	2,812836936	1,4946E-08	MFAP5	-2,1515998	2,1095E-08
NR1H4	2,592135513	7,38062E-11	C3	-2,0811644	2,9962E-09
CLDN2	2,440958467	3,51252E-07	LUM	-1,8057315	5,6068E-07
NR1D1	2,350735506	2,11011E-09	KRT7	-1,7459962	2,9746E-08
HES1	2,316562959	5,31249E-08	OPRPN	-1,6387219	1,2899E-05
CXCL6	2,118388048	6,89785E-07	EHF	-1,5793078	3,4844E-09
APCDD1L-AS1	1,933168699	2,71073E-08	WNT7A	-1,5521822	2,1101E-09
RPL22L1	1,885542249	4,4577E-13	SLCO2B1	-1,4213937	4,7274E-06
SLC27A2	1,812894431	2,91895E-07	ADGRF1	-1,4152315	1,2046E-09
KCNJ15	1,772868071	0,000109171	FABP3	-1,3842962	4,9308E-06
EFHB	1,712134413	3,57435E-07	MAP1B	-1,3263065	8,4725E-07
LINC01291	1,703898962	1,40247E-07	MUC1	-1,3139873	7,0926E-08
TCF4	1,678930336	2,87908E-08	ENTPD1	-1,3088421	8,5295E-06
KLF10	1,6788553	1,94101E-09	MACC1	-1,296171	7,5965E-09

A continuación se realizó el estudio de la significancia biológica de los 844 genes expresados diferencialmente en la comparación entre la mutación p.V523del y la forma WT mediante el análisis de enriquecimiento funcional (G-Profiler). Nuestros resultados muestran que estos genes estaban implicados en 4 funciones moleculares (Figura 48), 44 procesos biológicos (Figura 49) y 22 términos referentes a componentes celulares (Figura 50) se veían significativamente sobre-representados. La parte superior de cada figura es una representación de los términos GO encontrados significativamente sobre-representados y en la parte inferior una tabla que muestra los 20 términos GO

ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación.

**A**

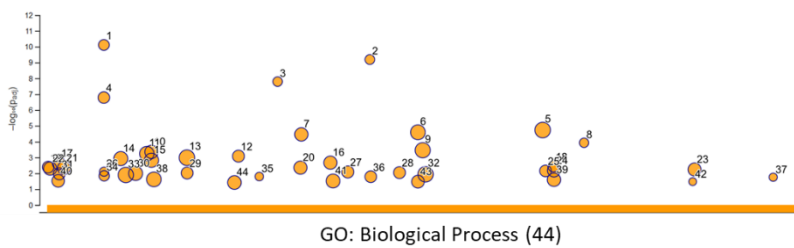


**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	catalytic activity, acting on DNA	GO:0140097	0,017707724	22
2	extracellular matrix structural constituent	GO:0005201	0,020368006	19
3	DNA helicase activity	GO:0003678	0,017990693	12
4	DNA replication origin binding	GO:0003688	0,018479985	7

Figura 48. Funciones Moleculares encontrados en la comparación V523del vs RCLC5 WT . A) Gráficas de puntos de las Funciones Moleculares (MF). B) Tabla resumen de los 4 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

**A**



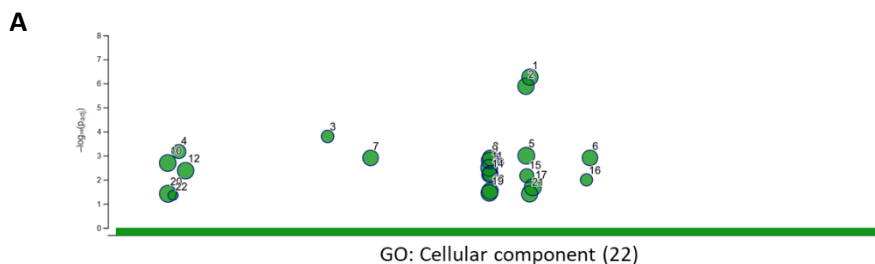
**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	1,8448E-05	336
2	cellular component organization	GO:0016043	0,00102855	319
3	system development	GO:0048731	0,00034841	259



4	animal organ development	GO:0048513	2,5565E-05	206
5	anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	0,00057377	160
6	tissue development	GO:0009888	0,00150157	126
7	cell cycle	GO:0007049	0,00117183	116
8	tube development	GO:0035295	3,4817E-05	84
9	animal organ morphogenesis	GO:0009887	0,00044287	78
10	growth	GO:0040007	0,00213514	72
11	tube morphogenesis	GO:0035239	0,00437458	67
12	blood vessel development	GO:0001568	0,00234666	59
13	DNA replication	GO:0006260	1,64E-07	37
14	extracellular matrix organization	GO:0030198	0,00082767	37
15	DNA-dependent DNA replication	GO:0006261	7,77E-11	31
16	G1/S transition of mitotic cell cycle	GO:0000082	0,00406503	29
17	monocarboxylic acid biosynthetic process	GO:0072330	0,00351379	26
18	cell cycle DNA replication	GO:0044786	6,47E-10	20
19	nuclear DNA replication	GO:0033260	1,60E-08	18
20	regulation of DNA-dependent DNA replication	GO:0090329	0,0001175	13

Figura 49. Procesos biológicos encontrados en la comparación V523del vs RCLC5 WT. A) Gráficas de puntos de los Procesos Biológicos (BP). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5



**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	cell	GO:0005623	0,0383347	698
2	cell part	GO:0044464	0,0205163	697
3	intracellular part	GO:0044424	0,0010114	621
4	intracellular	GO:0005622	0,0020255	621
5	organelle	GO:0043226	0,0032214	587
6	intracellular organelle	GO:0043229	0,0016052	558
7	membrane-bounded organelle	GO:0043227	0,0351512	539
8	cytoplasm	GO:0005737	0,0042178	511
9	intracellular membrane-bounded organelle	GO:0043231	0,0298049	483

10	organelle part	GO:0044422	1,308E-06	470
11	intracellular organelle part	GO:0044446	5,49E-07	460
12	intracellular organelle lumen	GO:0070013	0,001239	279
13	membrane-enclosed lumen	GO:0031974	0,001239	279
14	organelle lumen	GO:0043233	0,001239	279
15	intracellular non-membrane-bounded organelle	GO:0043232	0,005500	243
16	non-membrane-bounded organelle	GO:0043228	0,006300	243
17	chromosome	GO:0005694	0,000678	107
18	chromosomal part	GO:0044427	0,006868	97
19	extracellular matrix	GO:0031012	0,000159	46
20	collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	0,010138	34

Figura 50. Componentes celulares encontrados en la comparación V523del vs RCLC5 WT. A) Gráficas de puntos de los Componentes celulares (CC). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

Cabe mencionar que algunos de estos términos podrían estar relacionados con funciones o procesos que podrían atribuirse a la enfermedad de Dent. Entre estos términos hallamos, por ejemplo, funciones moleculares que incluyen la actividad catalítica, constituyentes estructurales de la matriz extracelular o la actividad helicasa del DNA, o bien procesos biológicos tales como el ciclo celular, morfogénesis y desarrollo del túbulo. La posible relación de estos términos con la enfermedad de Dent se discute en mayor profundidad en la sección de Discusión.

## 5.8 Impacto de la mutación p.E527D en la expresión génica

Para identificar los genes modulados específicamente por la reintroducción de la mutación p.E527D, comparamos la expresión génica de este mutante con la forma wild-type. Nuestros resultados mostraron que la reintroducción de la mutación p.E527D en una línea previamente silenciada para

*CLCN5* provocó una modificación en la expresión de 510 genes, de los cuales 306 se encontraron up-regulados y 204 down-regulados. Los 30 genes más up o down-regulados en la comparación p.E527D respecto a la forma WT se muestran en la tabla 31. Para algunos genes, se obtuvieron valores de logFC absolutos relativamente altos, sugiriendo que la mutación p.E527D en *CLC5* produce un efecto relevante en las células RPTEC/TERT.

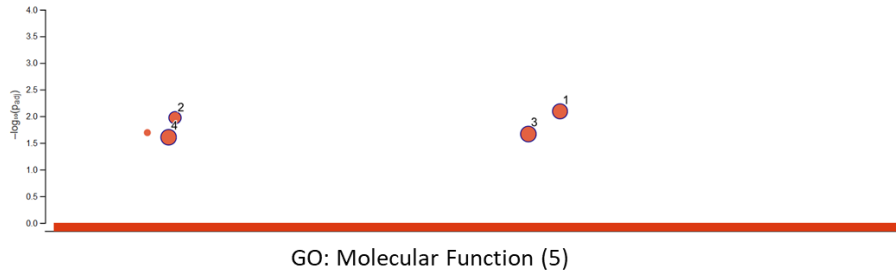
Tabla 31. Los 30 genes diferencialmente expresados en la comparación del mutante p.E527D vs *RCLC5wt*. Adj.P.Value < 0.05 y logFC>0.5.

<b>Up-regulados</b>			<b>Down-regulados</b>		
<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>
ZPLD1	2,2478877	5,697E-10	MFAP5	-2,37507893	8,8178E-09
TNNT1	1,9077313	1,1518E-08	FLG	-2,05833739	5,6017E-09
HLA-DRB1	1,7962948	8,8178E-09	NETO1	-1,86617226	4,6023E-06
SELENOP	1,7741324	8,6929E-07	EMX2	-1,55238184	7,3078E-08
CLDN2	1,6930449	0,0001184	CPT1A	-1,54937723	2,704E-08
HLA-DMA	1,5584828	7,3078E-08	LCP1	-1,46068346	3,044E-05
GPX3	1,5238048	3,3773E-06	THY1	-1,44404174	1,1259E-06
MAPRE3	1,5146465	2,8941E-06	C3	-1,35137449	5,6331E-06
NDST3	1,4930362	5,3534E-07	ABCB5	-1,30619631	0,00024186
LINC01508	1,4553088	6,5544E-05	NR1H4	-1,28721623	1,2428E-05
HLA-DPA1	1,4485085	1,029E-06	NPAS2	-1,28075039	1,4478E-09
SOSTDC1	1,4235496	0,0001493	KHDRBS3	-1,28061116	3,1426E-08
CORO2A	1,3801879	5,8778E-06	SGIP1	-1,19287156	1,8136E-07
PAQR5	1,3748296	0,00038225	ADAMTS9	-1,17484113	1,4828E-06
LUCAT1	1,3144751	3,0936E-06	CACNA2D3	-1,17019068	1,0215E-07

El análisis de significancia biológica de los genes modulados por la reintroducción de mutación p.E527D en células previamente silenciadas mostró que estaban implicados principalmente en 5 funciones moleculares (Figura 51), 86 procesos biológicos (Figura 52) y 18 términos referentes a componentes celulares (Figura 53). La parte superior de cada figura es una representación de los términos GO encontrados significativamente sobre-representados y en la parte inferior una tabla que muestra los 20 términos GO

ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación.

**A**

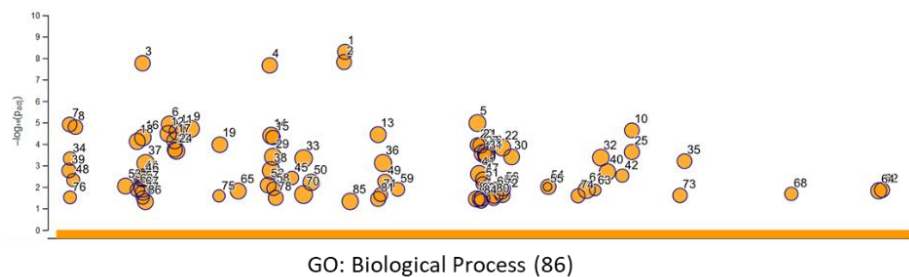


**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	identical protein binding	GO:0042802	0,01888272	65
2	signaling receptor binding	GO:0005102	0,02184936	61
3	protein-containing complex binding	GO:0044877	0,00724276	48
4	extracellular matrix structural constituent	GO:0005201	0,01029693	14
5	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase activity	GO:0004740	0,02037161	3

Figura 51. Funciones Moleculares encontrados en la comparación E527Ddel vs RCLC5 WT . A) Gráficas de puntos de las Funciones Moleculares (MF). B) Tabla resumen de los 5 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC>0.5

**A**



**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	response to stimulus	GO:0050896	0,0216698	254
2	multicellular organismal process	GO:0032501	0,02240487	218
3	signaling	GO:0023052	0,00171167	198
4	cell communication	GO:0007154	0,00379888	197
5	developmental process	GO:0032502	0,00046817	195
6	signal transduction	GO:0007165	0,01147983	183
7	multicellular organism development	GO:0007275	0,00078067	172
8	cell differentiation	GO:0030154	0,00039059	142
9	regulation of response to stimulus	GO:0048583	0,00249159	141
10	regulation of cell communication	GO:0010646	1,9661E-05	129
11	regulation of signaling	GO:0023051	4,0709E-05	129
12	response to organic substance	GO:0010033	2,6541E-05	123
13	cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	5,0258E-05	115
14	intracellular signal transduction	GO:0035556	0,0470085	97
15	movement of cell or subcellular component	GO:0006928	7,5859E-05	89
16	locomotion	GO:0040011	3,6658E-05	83
17	protein phosphorylation	GO:0006468	0,00908505	76
18	cell adhesion	GO:0007155	1,73E-08	74
19	regulation of phosphate metabolic process	GO:0019220	0,0155081	70
20	regulation of phosphorus metabolic process	GO:0051174	0,01610042	70

Figura 52. Procesos biológicos encontrados en la comparación E527D vs RCLC5 WT. A) Gráficas de puntos de los Procesos Biológicos (BP). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto logFC > 0.5

**A**



GO: Cellular component (18)

**B**

ID	Term Name	Term ID	adj.P.value	Nº genes
1	cell periphery	GO:0071944	0,000498956	176
2	plasma membrane	GO:0005886	0,000803216	172
3	plasma membrane part	GO:0044459	3,65E-04	107
4	whole membrane	GO:0098805	0,017881075	63
5	plasma membrane region	GO:0098590	8,76E-07	61
6	plasma membrane protein complex	GO:0098797	0,000863824	36
7	extracellular matrix	GO:0031012	1,99E-04	32
8	postsynapse	GO:0098794	0,005980633	32
9	axon	GO:0030424	0,006573932	32
10	dendrite	GO:0030425	0,025708076	30
11	dendritic tree	GO:0097447	0,027249539	30
12	collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	0,002377282	25
13	apical part of cell	GO:0045177	0,040101778	22
14	apical plasma membrane	GO:0016324	0,008222778	21
15	postsynaptic membrane	GO:0045211	0,029761896	20
16	extracellular matrix component	GO:0044420	0,008255788	8
17	MHC class II protein complex	GO:0042613	3,00E-04	6
18	MHC protein complex	GO:0042611	0,004318773	6

Figura 53. Componentes celulares encontrados en la comparación E527D vs RCLC5 WT. A) Gráficas de puntos de los Componentes celulares (CC). B) Tabla resumen de los 20 términos GO ordenados en función del número de genes de nuestra lista con esa determinada anotación. Adj.P. Value < 0.05 y valor absoluto logFC > 0.5

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de estos términos GO podrían estar relacionados directa o indirectamente con la enfermedad de Dent. Entre estos términos destacamos, por ejemplo, funciones moleculares como la unión a proteínas o la unión a receptores de señalización, o bien procesos biológicos tales como la comunicación celular y la

diferenciación celular. La posible relación de estos términos con la enfermedad de Dent se discute en mayor profundidad en la sección de Discusión.

### 5.9 Impacto de la mutación p.I524K en el perfil de expresión génica de las células RPTEC/TERT

Para identificar los genes modulados por la mutación p.I524K comparamos la expresión génica entre el mutante p.I524K y RCLC5 WT. Como se mencionó en la sección de descripción general del microarray y como se representó en la figura 47, la mutación p.I524K fue la condición que exhibió un menor cambio en los niveles de expresión génica respecto a la forma wild-type. Este análisis mostró que esta mutación sólo modulaba la expresión de 32 genes, de los cuales 26 estaban up-regulados y 6 down-regulados. Los 21 genes más up o down-regulados de la mutación p.I524K respecto a RCLC5 WT se muestran en la tabla 32. Como se ha destacado en anteriores ocasiones, este resultado es inesperado ya que cabría esperar que mutantes de clase produjeran un mayor cambio en la expresión génica.

Tabla 32. Los 21 genes diferencialmente expresados en la comparación del mutante p.I524K vs RCLC5wt. Adj.P.Value < 0.05 y logFC absoluto>0.5

<b>Up-regulados</b>			<b>Down-regulados</b>		
<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>
PREX1	1,05643951	0,02223309	CDH1	-1,1035702	0,02223309
CP	1,03115799	0,02223309	KRT7	-0,7464316	0,04456883
TMEM71	0,90215884	0,02223309	CATSPER1	-0,6614367	0,02223309
STEAP1	0,75277822	0,02223309	CLYBL-AS2	-0,6052113	0,04456883
EXOSC8	0,70184017	0,02485269	SLC38A8	-0,5875805	0,04456883
TCIM	0,66284648	0,03540495	CNGA2	-0,5167284	0,02223309
IQCD	0,66075948	0,02485269	-	-	-
DYNC2H1	0,66027249	0,02305972	-	-	-
LIN54	0,65591863	0,02352591	-	-	-
LRTOMT	0,62951556	0,02223309	-	-	-

ZRANB3	0,6281845	0,02485269
PLAG1	0,6241923	0,02223309
TNIK	0,61459199	0,02352591
TEX2	0,58021036	0,02485269
MIS12	0,57210271	0,02223309

-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-

El escaso número de genes modulados por la re-introducción de la mutación p.I524K respecto a la forma WT imposibilitó el análisis de significancia biológica. En este sentido, se intento relacionar directamente los genes modulados con la enfermedad de Dent. Este apartado se discute en la sección de Discusión.

### 5.10 Elementos comunes entre las mutaciones estudiadas a nivel de expresión génica

Para identificar y visaulizar aquellos genes cuya expression se veía modulada de forma comun por la re-introduccion de las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I527D, se analizaron aquellos elementos compartidos en las comparaciones de cada mutación respecto a la forma WT. Como se observa en la sección 5.2.2, este análisis nos reveló que sólo cinco genes variaban su expresión en todas las condiciones. En la tabla 33 se muestran los niveles de expresión de estos genes para cada condición.

Tabla 33. Genes comunes en las tres mutaciones estudiadas. Adj.P.Value < 0.05 y valor absoluto logFC > 0.5

<b>Gene.Symbol</b>	<b>logFC p.I524K vs WT</b>	<b>adjPval. p.I524K vs WT</b>	<b>logFC. p.E527D vs WT</b>	<b>adjPval. p.E527D vs WT</b>	<b>logFC. p.V523del vs WT</b>	<b>adjPval. p.V523del vs WT</b>
<b>CHCHD7</b>	0,55492	0,02223	0,57233	0,00076	1,06351	7,2224E-08
<b>LIN54</b>	0,65591	0,02352	0,50887	0,01267	0,68113	0,000580
<b>PLAG1</b>	0,62419	0,02223	0,55458	0,00208	1,095977	1,402E-07
<b>PREX1</b>	1,05643	0,02223	0,65860	0,04225	-0,72651	0,015824
<b>ZRANB3</b>	0,62818	0,02485	0,54173	0,00716	0,60569	0,00167



En la tabla 33 se puede observar que todos los genes se encuentran up-regulados en todas las comparaciones analizadas excepto el gen PREX1, que se encuentra down-regulado únicamente en la comparación de la mutación p.V523del con la forma WT. Cabría esperar que si estos genes se modulan de forma común para todas las mutaciones es porque equivaldrían al silenciamiento. Curiosamente, sólo el gen PREX1 se ve afectado por el silenciamiento de *CLCN5*, lo que podría sugerir que el resto de genes comunes entre las diferentes mutaciones de estudio podrían ser una ganancia de función respecto a la ausencia de proteína. La posible implicación de estos genes de estos genes con la patología de estudio se discutirá en mayor profundidad en la sección de Discusión.

## 6. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA CLC-WT Y MUTADA

### 6.1 Descripción general

Toda proteína ejerce sus funciones a través de interacciones con otras moléculas. La interacción específica de una proteína de función desconocida con otra de función conocida nos puede proporcionar información acerca de los procesos en que es participe. Una de las técnicas más idóneas para determinar interacciones entre proteínas es la técnica de co-inmunoprecipitación combinada con la identificación mediante espectrometría de masas (MS, de sus siglas en inglés). En este trabajo hemos empleado estas técnicas con el fin de identificar interacciones moleculares con la proteína CLC-5 WT o las formas mutantes de CLC-5 p.V523del, p.E527D y p.I524K. En primer lugar, se realizaron los ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando microesferas de agarosa acopladas a un anticuerpo capaz de reconocer la secuencia de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) del epítipo HA. De esta manera las microesferas de agarosa inmunoprecipitaron la proteína CLC-5 WT o mutada fusionada al HA y todas aquellas proteínas unidas a ellas. A continuación, las proteínas co-inmunoprecipitadas en cada condición se enviaron a analizar al Proteomics Core Facility del instituto EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) de Heidelberg para su identificación mediante MS.

Las líneas que empleamos para este ensayo fueron las siguientes: shCLC5, RCLC5wt, V523del, E527D y I524K. La línea shCLC5 se utilizó como nuestro control negativo ya que, al no expresar la proteína CLC-5 fusionada al HA, nos permitió descartar las uniones inespecíficas. La identificación de

nuevas interacciones proteicas se realizó en células cultivadas durante 10 días y se utilizaron 3 réplicas biológicas por condición obtenidas en días independientes.

Para el análisis de los datos obtenidos se incluyeron aquellas proteínas que se cuantificaron con al menos dos péptidos únicos en dos de las tres réplicas como mínimo. Las proteínas se consideraron como 'hit' cuando presentaban un FDR (de sus siglas en inglés, False Discovery Rate) menor del 5% y un *fold change* mayor del 100% y se consideraron como 'candidatos' cuando presentaba un FDR menor del 20% y un *fold change* mayor del 50%. Finalmente, se asignó un valor numérico a cada proteína co-immunoprecipitada en función de la cantidad de proteína detectada al analizar las muestras por MS.

En el Heatmap de la Figura 54 se muestran las 30 proteínas inmunoprecipitadas con un mayor valor numérico en alguna de las condiciones y que se podían considerar "hits" teniendo en cuenta los criterios descritos en el párrafo anterior. En este heatmap, las filas corresponden a proteínas y las columnas corresponden a cada condición experimental (o sea, a las diferentes líneas celulares). La intensidad de señal se expresa mediante una escala de color que va desde valores bajos de interacción (azul) hasta valores altos de interacción (rojo). Las interacciones proteicas se han agrupado por grupos o clusters. El término *clustering* hace referencia a un conjunto de algoritmos que permiten encontrar patrones o grupos (*clusters*) dentro de un conjunto de observaciones. Las particiones se establecen de forma que, las observaciones que están dentro de un mismo grupo, son similares entre ellas y distintas a las observaciones de otros grupos. El análisis de clústers es un método que nos permite agrupar las interacciones proteicas comunes entre todos los grupos y aquellas que son específicas de cada grupo.

Nuestros resultados en la figura 54 muestran que las interacciones proteicas identificadas se han distribuido en 5 clusters en función de sus niveles de interacción. Estos 5 clusters incluyen: i) proteínas que interaccionan en mayor medida con la forma CLC-5 I524K, ii) proteínas que interactúan en mayor medida con el CLC-5 E527D, iii) proteínas que interactúan en mayor medida con el CLC-5 V523del, iv) proteínas que interactúan en mayor medida con el CLC-5 WT, y v) proteínas que interactúan de igual forma ya sea con el CLC-5 WT o mutado.

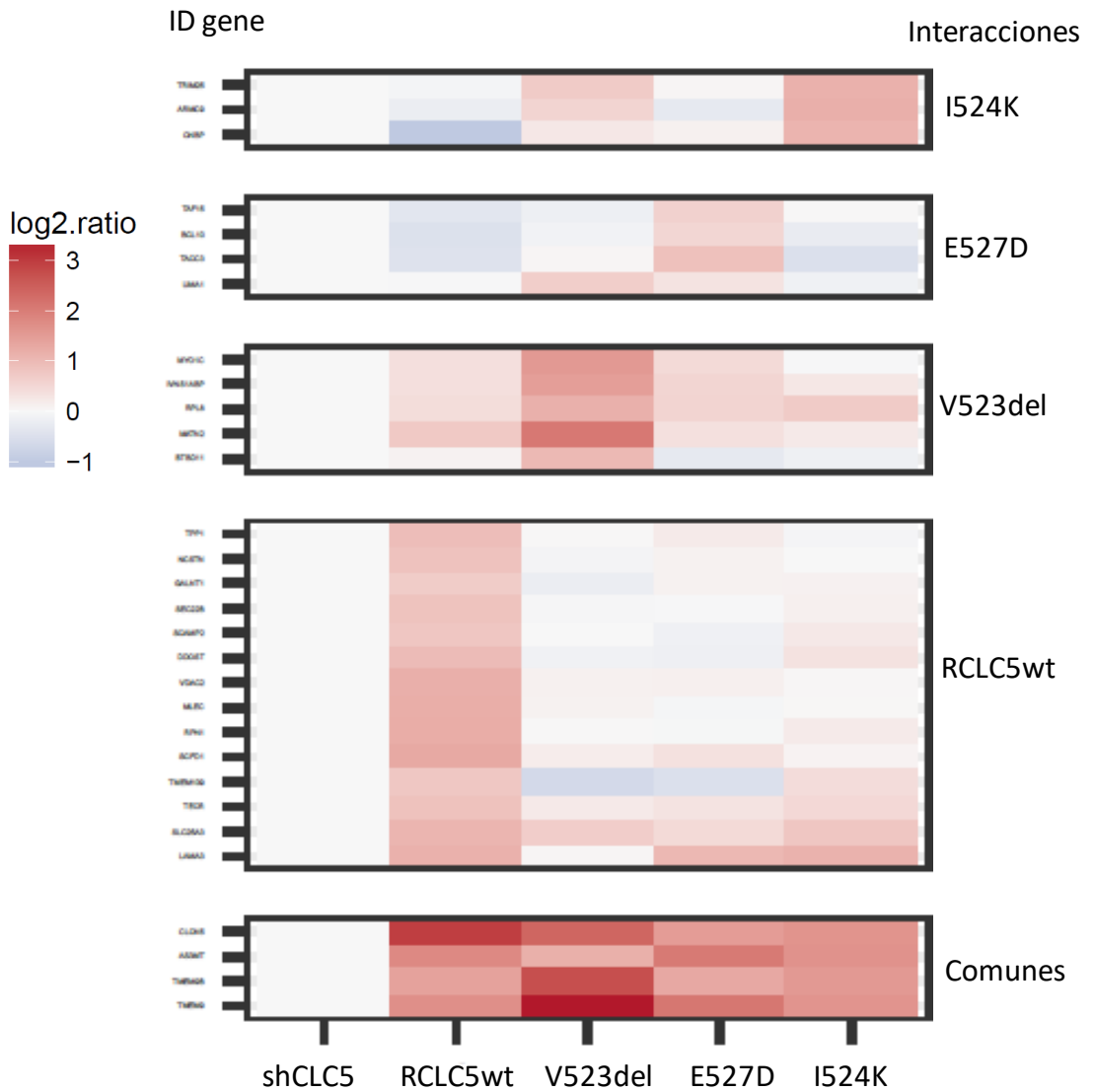


Figura 54. Representación de las interacciones proteicas mediante Heatmaps. Las proteínas se consideraron como "hit" cuando presentaban una ratio FDR menor del 5% y un fold chang mayor que 100%, y se consideraron proteínas "candidatas" cuando presentaban un FDR menor del 20% y un fold change mayor del 50%. En la figura se muestra las interacciones específicas para cada condición.

No resulta sorprendente que se identificaran un mayor numero de proteínas en la condición CLC5-WT, lo que viene a indicar que cuando CLC-5 se encuentra en su forma "wild-type" o "nativa" es capaz de interactuar de

forma más eficaz con sus interactores proteicos. Por el contrario, las formas mutadas p.V523del, p.E527D, y p.I524K presentaron no solo un menor número de interacciones proteicas, pero también nuevas interacciones que no se observaban para la forma wild-type y que se corresponderían a una “ganancia de función” respecto a la forma wild-type. De esta forma estos resultados indican que al introducir estas mutaciones en la proteína CLC-5 estamos alterando el patrón de interacciones proteicas de CLC-5, de manera que algunas interacciones que se observaban para la forma wild-type desaparecen al mutar la proteína, y otras mutaciones que no se observaban en la forma wild-type aparecen al mutar la proteína. En este sentido, cada mutación afecta al patrón de interacciones de CLC-5 de forma específica. Es igual de interesante el hecho de identificar un subgrupo de proteínas cuya interacción con CLC-5 no se ve afectada por ninguna de las mutaciones. Esto viene a indicar que los cambios que cualquiera de las mutaciones pueda provocar en el CLC-5, ya sea de localización sub-celular, función o presencia en macrocomplejos moleculares no afectan a la interacción con estas proteínas.

Como se ha mencionado al inicio de esta sección, la identificación de nuevas interacciones de CLC-5 con proteínas cuya función es conocida puede ayudar a esclarecer en gran medida el papel exacto de CLC5 en las células del túbulo proximal. Es más, identificar la función de las proteínas que interactúan de forma común o bien específicamente con el CLC-5 wild-type y/o mutado podría ayudar a entender mejor los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Dent.

Con el fin de profundizar en el papel biológico de las nuevas interacciones de las proteínas asociadas a la proteína CLC-5 WT o mutadas se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica mediante el sistema de búsqueda Pubmed. Pubmed es un proyecto desarrollado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) que permite el acceso a bases de datos

bibliográficas compiladas por la National Library of Medicine (NLM). Para la búsqueda del papel biológico de estas nuevas proteínas interactuantes con CLC-5 WT o las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K se utilizaron los términos de búsqueda [riñón] o [endocitosis] o [CLC-5] de forma combinada con el nombre de la proteína en cuestión. Aplicamos esta modalidad de búsqueda para ver si las proteínas identificadas tenían alguna relación con la funcional renal, si forman parte de algún complejo involucrado en procesos de endocitosis, o bien si se había alguna relación con nuestra proteína de interés. Las interacciones proteicas descritas en el Heatmap se describen en los siguientes puntos a través de tablas, donde se pueden observar los nombres de las diferentes proteínas y sus funciones principales.

## 6.2 Identificación de las interacciones con la proteína CLC- WT

En la tabla 34 se muestran los resultados de la búsqueda bibliográfica, donde se puede observar los nombres de las diferentes proteínas que presentaban un mayor grado de interacción con la forma wild-type, sus funciones principales y si estaban relacionadas con los términos de búsqueda anteriormente descritos.

*Tabla 34. Interacciones proteicas con la proteína CLC-5 WT.*

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Funciones</b>	<b>Relación con algunos de los términos</b>
<b>DDOST</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	Glicosilación	Riñón
<b>GALNT1</b>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	Glicosilación	Riñón
<b>MLEC</b>	Malectin	Glicosilación	-
<b>RPN1</b>	Riboforin I	Glicosilación	Riñón
<b>SCAMP2</b>	Secretory carrier-associated membrane protein 2	Funcionan como portadores a la superficie celular en las	Riñón y endocitosis

		vías de reciclaje post-golgi	
<b>SEC22B</b>	Vesicle-trafficking protein SEC22b	Tráfico de proteínas ER-Golgi	Riñón y endocitosis
<b>LAMA3</b>	Laminin subunit alpha-3	Formación de membrana basal y migración.	Riñón
<b>NCSTN</b>	Nicastrin	Cataliza la escisión de proteínas integrales de membrana	Riñón y endocitosis
<b>TECR</b>	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	Localizada en el ER: reduce la trans-2,3-enoil-CoA a acil-CoA	-
<b>SLC25A3</b>	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Cataliza el transporte de fosfato hacia las mitocondrias.	-
<b>VDAC2</b>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Participa en la difusión de los metabolitos a través de mitocondrias/ Apoptosis	-
<b>SCFD1</b>	Sec1 family domain-containing protein 1	-	-
<b>TMEM109</b>	Transmembrane protein 109	-	-
<b>TPP1</b>	Tripeptidyl-peptidase 1	Proteasa lisosomal	Riñón y endocitosis

Algunas de estas proteínas podrían explicar las funciones o procesos que desempeña CLC-5 en las células del túbulo proximal en condiciones no patológicas. Entre esas interacciones proteicas identificadas encontramos, por ejemplo, proteínas relacionadas con el proceso de glicosilación, un proceso importante para la correcta maduración de las proteínas y el tránsito a otros compartimentos celulares o bien proteínas relacionadas con tráfico de proteínas RE-Golgi, entre otras. La posible relación de estos términos con la enfermedad de Dent se discute en mayor profundidad en la sección de Discusión.



### 6.3 Identificación de las interacciones con la proteína mutada V523del

En la tabla 35, se pueden observar los nombres de las diferentes proteínas que interactuaban en mayor grado con la mutación p.V523 del, sus funciones principales y si estaban asociadas a los términos de búsqueda riñón, endocitosis o CLC-5.

*Tabla 35. Interacciones proteicas con la proteína mutada V523del*

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Funciones</b>	<b>Relación con algunos de los términos</b>
<b>BTBD11</b>	Ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein BTBD11	-	-
<b>IVNS1ABP</b>	Influenza virus NS1A-binding protein	-	-
<b>MATN2</b>	Matrilin-2	Participa en la formación de redes filamentosas en la Matriz Extracelular	-
<b>MYO1C</b>	Unconventional myosin-1c	Motor molecular basado en actina	Riñón y endocitosis
<b>RPL8</b>	60S ribosomal protein L8	Proteína ribosómica (Componente 60S)	Riñón

### 6.4 Identificación de las interacciones con la proteína mutada E527D

En la tabla 36 se pueden observar los resultados de la búsqueda bibliográfica realizados en el portal Pubmed, donde se muestran las interacciones que se identificaron en mayor grado con la mutación p.E527D, sus funciones principales y la posible relación con los términos de búsqueda seleccionados.

Tabla 36. Interacciones proteicas con la proteína mutada E527D

Proteína	Proteína	Funciones	Relación con algunos de los términos
<b>BCL10</b>	B-cell lymphoma/leukemia 10	Induce la apoptosis y activa NFKB	Riñón
<b>LIMA1</b>	LIM domain and actin-binding protein 1	Inhibe la despolimerización del filamento de actina	-
<b>TACC3</b>	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	Estabilización del huso mitótico	-
<b>TAF15</b>	TATA-binding protein-associated factor 2N	Desempeña un papel en la transcripción de la RNA II polimerasa	-

## 6.5 Identificación de las interacciones con la proteína mutada I524K

En la tabla 37 se muestran las proteínas que interactuaban en mayor grado con la mutación p.I524K, sus funciones principales y si presentaban alguna relación con los términos riñón, endocitosis o CLC-5 utilizados en la búsqueda.

Tabla 37. Interacciones proteicas con la proteína mutada I524K

Proteína	Proteína	Funciones	Relación con algunos de los términos
<b>ARMC9</b>	LisH domain-containing protein ARMC9	-	Riñón
<b>CNBP</b>	Cellular nucleic acid-binding protein	Traducción / transcripción mediada por esteroides	-
<b>TRIM25</b>	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	Transcripción (¿acciones mediadoras de estrógenos?)	-

## 6.6 Identificación de las interacciones proteicas comunes con la forma WT y las formas mutadas

En la tabla 38, se puede observar los nombres de las diferentes proteínas que interactuaban tanto con la forma WT como con las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K, las funciones que se le atribuyen y la asociación con los términos de búsqueda establecidos.

*Tabla 38. Interacciones proteicas con la forma CLC-5 WT y las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K.*

Proteína	Proteína	Funciones	Relación con algunos de los términos
<b>AS3MT</b>	Arsenite methyltransferase	Metabolismo del arsénico	Riñón
<b>CLCN5</b>	H(+)/Cl(-) exchange transporter 5	Canal de iones de cloruro	Riñón y endocitosis
<b>TMEM9</b>	Transmembrane protein 9	-	-
<b>TMEM9B</b>	Transmembrane protein 9B	-	-

## 6.7 Validación de la interacción obtenida entre la proteína TMEM9 y CLC-5 WT o mutado

Para confirmar las interacciones observadas para CLC-5 WT y las formas mutadas mediante co-immunoprecipitación seguida de MS, decidimos validar estos experimentos utilizando un segundo modelo donde se realizaron inmunoprecipitaciones en “ambos sentidos” y se validaron mediante Western Blot (ver Materiales y Métodos). En el momento actual estamos realizando estos experimentos y por el momento ya se ha validado la interacción TMEM9 y CLC-5.

Para ello, se co-transfectaron células HEK-293T simultáneamente con la proteína TMEM9 fusionada a un tag Flag y la forma CLC-5 WT o mutante fusionada a un tag HA. Los lisados obtenidos en cada condición experimental se dividieron en dos tubos cada uno de los cuales se incubó bien con microesferas de agarosa unidas a anticuerpo contraHA (para la inmunoprecipitación de CLC-5 HA) o bien con microesferas unidas a anticuerpo anti Flag (para la inmunoprecipitación de-TMEM-Flag). Las proteínas co-immunoprecipitadas en cada caso fueron analizadas específicamente mediante western blot utilizando anticuerpos contra el tag HA o contra el tag Flag (Figura 55).

En la parte superior de la figura 56 se indican las condiciones experimentales correspondientes a cada carril del Western Blot. El carril número 1 corresponde al control de transfección, es decir, células que han sido transfectadas con vectores “vacíos” o control y que por lo tanto no expresan ni CLC5 -HA ni TMEM9-Flag. Los carriles 2 al 6 corresponden a muestras provenientes de células que han estado todas transfectadas con el vector portador de TMEM9-Flag. Los carriles número 2 y 3 corresponden a muestras que expresan la forma CLC-5 WT; el número 4 a muestras que expresan la mutación p.V523del, el número 5 a muestras que expresan la mutación p.E527D y finalmente el 6 corresponde a muestras que expresan el mutante p.I524K.

Los 3 paneles superiores de la a figura 55 corresponden al “Input”, es decir, al extracto inicial utilizado para inmunoprecipitar las correspondientes proteínas. Analizar el “input” nos ayuda a asegurarnos de que hemos partido de igual cantidad de proteína “bait” (también llamada “cebo”) en nuestros extractos a la hora de realizar la inmunoprecipitación. Nuestros resultados muestran que las células HEK-293T expresan iguales niveles de TMEM9-Flag en todas las muestras donde se ha sobre-expresado la proteína. No se observa

lo mismo para el CLC5-HA, donde sus niveles de expresión varían considerablemente en función de que se sobre-exprese la forma WT o los diferentes mutantes. En este sentido, CLC5 WT i CLC5 523del presentaron buenos niveles de expresión mientras que la forma I524K mostró niveles muy bajos de expresión. Estos resultados van en el mismo sentido que aquellos observados en células RPTEC/TERT transducidas de forma estable con vectores lentivirales y confirman que la forma I524K de CLC5 presenta una menor estabilidad o vida media que el resto de formas de CLC5 estudiadas.

En los paneles correspondientes a la co-immunoprecipitación con HA (los 2 paneles intermedios) podemos observar lo siguiente: i) que los niveles de CLC5 que se inmunoprecipitaron (proteína “bait”) fueron parecidos en todos los casos excepto para el carril correspondiente a la muestra I524K. Este hecho era de esperar considerando que partíamos de menos “input”; ii) que la inmunoprecipitación de CLC-5-HA es específica ya que al utilizar un anticuerpo control de la misma especie (IgG de rata) para inmunoprecipitar el CLC-5 HA no se observó ninguna banda en el peso molecular esperado; iii) que la proteína TMEM9 interacciona con las forma WT de CLC-5 y con todas las formas mutadas estudiadas (Panel HA-IP-D), ya que observamos una banda correspondiente al peso de TMEM9 (proteína “prey” o presa) al revelar las muestras con un anticuerpo anti-Flag. Por lo tanto, este resultado nos confirma los resultados obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas son fiables.

Los paneles E y F que corresponden a la co-inmunoprecipitación con Flag podemos observar lo siguiente: i) que los niveles de Flag que se inmunoprecipitaron fueron similares en todos los casos. ii) que la inmunoprecipitación de TMEM9-Flag es específica ya que al utilizar un anticuerpo control de la misma especie (IgG de ratón) para inmunoprecipitar TMEM9-Flag no se observó ninguna banda en el peso molecular esperado

(Panel F); iii) que la proteína TMEM9 interacciona con todas las mutaciones estudiadas pero cabe resaltar que con la forma CLC-5 muestra un mayor grado de interacción (Panel E), ya que observamos una banda correspondiente al peso de CLC-5-HA (proteína “prey” o presa) al revelar las muestras con un anticuerpo anti-HA. Por lo tanto, este resultado nos confirma los resultados obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas son fiables.

Estos resultados nos confirman la interacción entre la proteína TMEM9 y CLC-5.

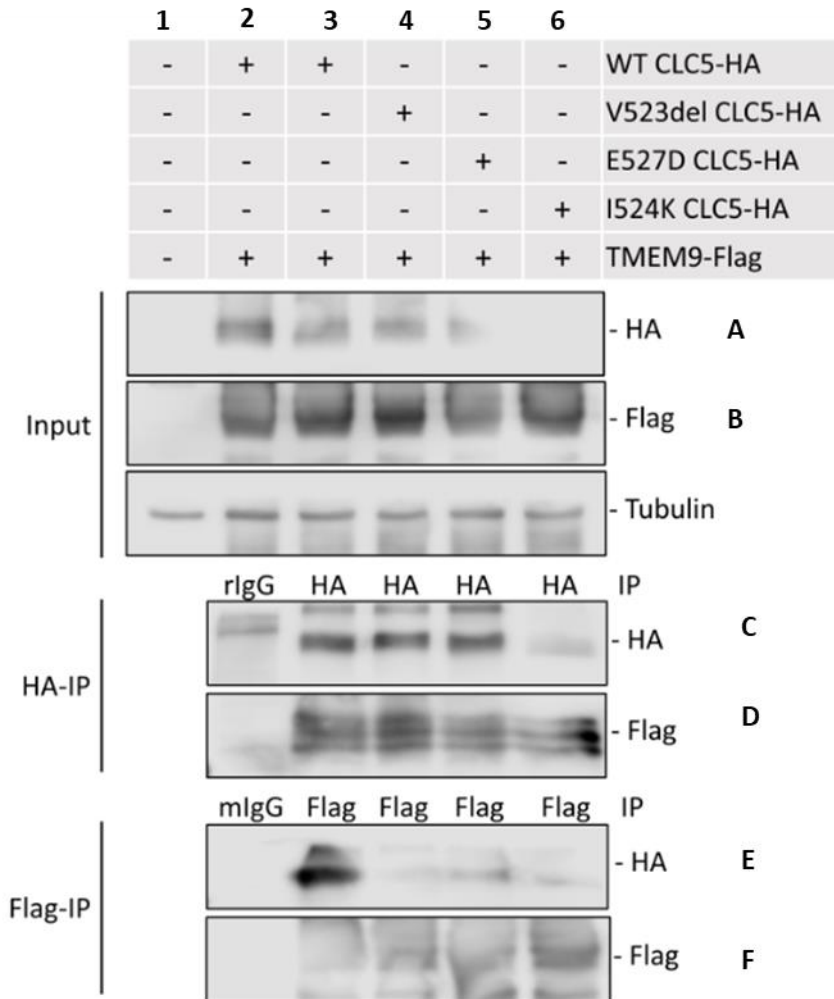


Figura 55. Interacción entre la proteína TMEM9 y las formas CLC-5WT y mutadas. Paneles A y B corresponden al INPUT, es decir, al extracto inicial utilizado en la inmunoprecipitación. Los paneles C y D corresponden a la co-immunoprecipitación con HA. Los paneles E y F corresponden a la co-immunoprecipitación con HA.





# DISCUSIÓN

## 1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN *CLCN5*

La enfermedad de Dent de tipo 1 es un trastorno hereditario poco frecuente caracterizado por PBPM, hipercalciuria, nefrocalcinosis, nefrolitiasis y raquitismo, que progresa a enfermedad renal y terminal<sup>14,19,60</sup>. Es una enfermedad provocada por mutaciones en el gen *CLCN5*<sup>59</sup>. Este gen codifica para el cotransportador de cloro CIC-5 expresado principalmente en el túbulo proximal. Las mutaciones en *CLCN5* provocan una interrupción en el tráfico de vesículas y en el transporte intracelular. En la actualidad, no existen tratamientos específicos ni ensayos clínicos activos y el cuidado es de soporte.

Actualmente, se han identificado al menos 234 mutaciones en el gen *CLCN5* y aproximadamente la mitad de ellas ocasionan una pérdida de la función<sup>102</sup>. Estudios funcionales realizados en ovocitos de *Xenopus laevis*<sup>33,108,139</sup> o en las líneas celulares HEK-293<sup>42,103,108,114</sup> y Opossum Kidney<sup>140-142</sup> han permitido agrupar las mutaciones de *CLCN5* en tres clases en función de su localización sub-celular y actividad electrogenica<sup>17</sup>. En la actualidad en la mayoría de mutaciones todavía se desconoce la distribución subcelular de CLC-5 y las consecuencias a nivel funcional y transcripcional.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos que conducen a la fibrosis túbulo-intersticial y para analizar el impacto de mutaciones en el gen *CLCN5* en células de túbulo proximal, generamos líneas celulares derivadas del túbulo proximal humano (RPTEC/TERT y HK-2) con el gen *CLCN5* silenciado o portadoras de mutaciones en dicho gen.

En cuanto a la elección de las mutaciones de estudio, se seleccionaron las mutaciones (p.V523del (c.1566-1568del), p.E527D (c.1581A>T) y p.I524K (c.1571T>A)). Esta elección se basa en *que solo* existen 3 pacientes en el mundo que presentan la mutación p.V523del<sup>68,102,104</sup> y uno de ellos,

diagnosticado en el Hospital Vall d'Hebrón, presenta una manifestación muy acusada de la enfermedad. La valina 523 se localiza en la hélice P, una de las hélices involucradas en la formación del homodímero de CLC-5. Respecto a la caracterización funcional de esta mutación, estudios electrofisiológicos previos en la línea celular HEK demostraron que las corrientes eléctricas mediadas por CLC-5 en la membrana plasmática se redujeron<sup>68</sup>. En base a la localización de la mutación p.V523del, se escogieron dos mutaciones adicionales la p.I524K (c.1571T>A) y la E527D (c.1581A>T) clasificadas como clase 1 y clase 2, respectivamente <sup>114</sup>, por encontrarse en el mismo dominio proteico (Figura 56) estudios de electrofisiología, demostraron que ambas mutaciones presentaban una reducción en la corrientes eléctrica en la membrana plasmática <sup>114</sup>.

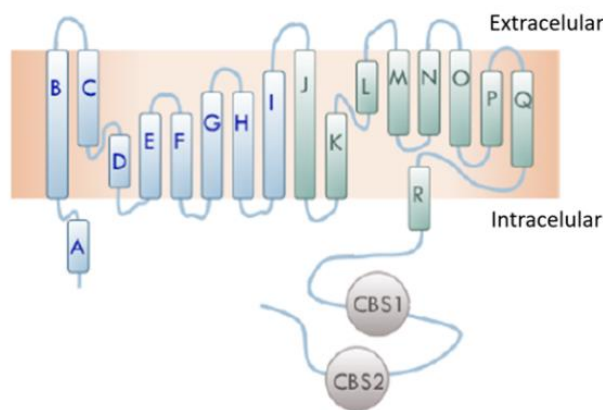


Figura 56. Representación esquemática de la proteína CLC-5. Modificado de<sup>34</sup>.

Los resultados de western blot mostraron que todas las formas de CLC-5 reintroducidas se expresaron correctamente en los dos modelos celulares utilizados (RPTEC/TERT y HK-2), observándose una banda mayoritaria alrededor de los 80 KDa y bandas difusas (smear) de tamaño superior. Este patrón de bandas, propio de proteínas asociadas a membrana con un alto contenido en lípidos, también fue descrito en extractos de riñón

de animales CLC-5 WT<sup>143</sup> y en células HEK-MSR, tanto para la forma CLC-5 WT como para las mutaciones p.I524K y p.E527D<sup>144</sup>. Nuestros resultados muestran que en ambas líneas, las mutaciones presentaron unos niveles proteicos menores que la forma WT aunque estos no se correspondieron con aquellos observados a nivel de mRNA. Este hecho especialmente destacable para la mutación p.I524K, la cual presentaba los niveles de proteína más bajo, sugería la existencia de modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales capaces de modificar la estabilidad de la proteína.

Se ha descrito que la proteína CLC-5 sufre modificaciones post-traduccionales entre las que se incluyen la glicosilación<sup>108</sup>. La N-glicosilación es una modificación que sufren las proteínas en el RE donde se produce una unión entre los oligosacáridos y el grupo amino de una asparagina que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr de las proteínas<sup>144</sup>. Los glicanos añadidos son modificados posteriormente en el RE para que las glicoproteínas nacientes puedan interactuar con chaperonas del RE para su correcto plegamiento y transporte al aparato de Golgi, donde adquieren estructuras más complejas por procesamiento y adición de más monosacáridos<sup>145,146</sup>. Por esta razón, este proceso es importante para el plegamiento, estabilidad, transporte o incluso en la función que desempeñe una proteína<sup>147</sup>.

Nuestros resultados demuestran que las proteínas CLC-5 WT y mutadas presentaban N-glicosilaciones entre GlcNAc y asparagina. Cabe resaltar, que la mutación p.I524K presentó una disminución en el peso molecular cuando se digirió con la enzima PNGasa. Estos resultados podrían sugerir la mutación p.I524K presentaba un menor grado de glicosilación sensible a la digestión con PNGasa, este hecho podría conllevar a un menor tránsito hacia otros compartimentos celulares donde adquieren estructuras más complejas<sup>145,146</sup>.

Smith y colaboradores<sup>114</sup> sugieren que los mutantes CLC-5 más resistentes, es decir, aquellos que presenten proteínas glicosiladas de mayor peso molecular, serán aquellos que puedan transitar a la superficie celular y pasar corrientes, sugiriendo un vínculo entre la estabilidad de la proteína y su capaz para escapar del RE.

Tal y como muestran nuestros resultados, la mutación p.I524K exhibió un mayor grado de superposición con KDEL, un marcador de RE, y no se localizó en otros compartimentos subcelulares, tales como membrana plasmática y endosoma primario. La retención de los canales de iones en RE es un mecanismo común en muchas enfermedades, como por ejemplo, mutaciones en el canal CFTR (de sus siglas en inglés, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) responsables de la fibrosis quística<sup>148</sup>, o mutaciones en los canales KATP (de sus siglas en inglés, *ATP-sensitive potassium*) responsables del hiperinsulinismo congénito<sup>149</sup>. Los resultados obtenidos en las células RPTEC/RERT tras el tratamiento con ciclohexamida, confirmaron que la mutante p.I524K, previamente clasificada como de Clase 1, presentó una vida media inferior al resto de condiciones, por lo tanto, una menor estabilidad. Este tipo de mutaciones son aquellas que afectan el procesamiento y el plegamiento de proteínas que quedan retenidas en el retículo endoplásmico y se degradan mediante mecanismos de control de calidad<sup>17</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, las proteínas CLC-5 WT y las mutadas para los residuos p.V523del y p. E527D mostraron formas glicosiladas de mayor peso molecular y vida media similar. Sin embargo, la proteína CLC-5 que presenta la mutación p.I524K mostró un menor grado de glicosilación, probablemente debido a la retención que sufre esta forma proteica en el RE. Estos resultados sugieren que la mutación p.V523del, motivo principal de nuestro estudio, no sería una mutación del tipo 1.

Reforzando este concepto, los experimentos de microscopía confocal, mostraron que las formas CLC-5 WT y las mutadas para los residuos p.V523del y p.E527D exhibieron un menor grado de superposición con el marcador de RE (KDEL), sugiriendo que podrían escapar eficientemente del RE; de nuevo, el patrón mostrado por la forma p.I524K se superponía de forma evidente con el marcador de este compartimento sub-celular. Por otro lado, experimentos de co-localizaban con el marcador de endosoma (Rab5) mostraron que las formas WT y mutantes, V523del y E527D se encontraban en los endosomas, mientras que la p1524K no. Es importante destacar que la localización subcelular de las formas mutadas para los residuos p.I524K y p.E527D coinciden con estudios previos realizados en células HEK<sup>114</sup>, lo que validaría nuestros modelos celulares por un lado y permitiría descartar la mutación V523del como de clase 1, por otro. Por lo que respecta al tránsito de las proteínas CLC-5 WT y mutadas a la membrana plasmática, los ensayos de co-localización con N-cadherina indicaron que sólo una pequeña fracción de la proteína CLC-5 WT fue capaz de dirigirse a la membrana. El aparente fallo del reciclaje de las proteínas CLC-5 mutadas a la membrana plasmática podría sugerir que el proceso de endocitosis para las formas mutantes estaría comprometido. Sakamoto et al<sup>27</sup> describieron que el transporte entre la membrana del “brush border” de las células del túbulo proximal y las vesículas subapicales es un proceso dinámico, que dificulta la observación de la proteína CLC-5 en la membrana. Por todo ello, la caracterización funcional de los modelos celulares en estudio se realizó mediante ensayos de endocitosis.

Los resultados obtenidos en ensayos de captación de albúmina<sup>488</sup> por microscopía confocal en las líneas RPTEC/TERT y HK-2 silenciadas para el gen *CLCN5* o con expresión de la proteínas CLC-5 wt y mutadas confirmaron que tanto el silenciamiento de *CLCN5* como la presencia de las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K alteraban de forma importante la capacidad endocítica de las células. De igual forma, los ensayos de captación de albúmina

por técnicas fluorométricas en esas mismas células mostraron una disminución significativa en los niveles de captación de albúmina en las líneas silenciadas y mutadas respecto a la línea control, confirmando el papel clave de CLC-5 en la endocitosis mediada por receptor. Curiosamente, y a diferencia de lo observado con las técnicas de microscopia confocal, la re-introducción de la mutación p.E527D sí que fue capaz de restablecer los valores de fluorescencia. Por otro lado, estos resultados son consistentes con los obtenidos en los modelos de ratones KO<sup>87,90,111,117</sup> o KI<sup>127</sup> para *CLCN5* y en células derivadas de pacientes Dent, que mostraban que tenían una endocitosis mediada por receptor defectuosa<sup>112</sup>.

Los ensayos de competencia demostraron que el co-tratamiento con albumina no marcada no produjo una reducción total en los niveles de albúmina en ninguna línea celular. De igual forma, los experimentos en presencia de Bafilomicina A1 demostraron una reducción en los niveles de albumina488 en no más del 50%. Este hecho podría sugerir la existencia de otro mecanismo paralelo de entrada de albúmina. Existen estudios que atribuyen al receptor neonatal para FC (FcRn) la captación de albúmina en las células del túbulo proximal<sup>150,151</sup>.

Es importante mencionar que, nuestros resultados son consistentes con estudios previos donde demostraron que células derivadas de pacientes Dent provocaron defectos en la captación de transferrina<sup>112</sup>. En dicho estudio, Gorvin y sus colaboradores<sup>112</sup> mostraban que las mutaciones 30:insH, del132-241 y R637X en el gen *CLCN5* producían una disminución significativa en la captación de transferrina respecto a la forma WT. De igual forma, nuestros resultados de microscopia confocal mostraron que las mutaciones p.V523del, p.E527D y p.I524K provocaron una disminución de la captación de transferrina respecto la condición control y un patrón de distribución más localizado. Sin

embargo, el silenciamiento de *CLCN5* produjo un efecto muy leve en la captación de este ligando.

Los experimentos de competencia realizados por Gorvin et al<sup>112</sup>, nos demuestran que el co-tratamiento con transferrina no marcada no produjo una reducción total en los niveles de transferrina en ninguna de las mutaciones estudiadas. Estos resultados sugieren que la captación de transferrina se está produciendo por otro mecanismo de absorción no dependiente del receptor cubilina. En este sentido, existen trabajos donde se ha descrito la existencia de un receptor de transferrina (TfR1) en células de túbulo proximal que podrían explicar estos resultados observados<sup>152-154</sup>.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo era la generación y caracterización de líneas de túbulo proximal humano silenciadas para el gen *CLCN5*, con posterior re-expresión de proteínas WT y mutadas para los residuos p.V523del, p.E527D y p.I524K, con especial interés en la mutación p.V523del. Estas líneas han mostrado ser buenos modelos celulares de la enfermedad de Dent1 y han permitido observar que la mutación p.V523del no sería de clase puesto que el patrón de N-glicosilación difiere del obtenido en la mutación de clase 1 (p.I524K). Reforzando este concepto, la variante p.V523del de CLC-5 co-localiza con el marcador de endosoma Rab5 y no queda retenida en el RE, como es característico para las mutaciones de clase 1. Por todo ello, aunque la mutación p.V523del no parece ser de clase 1, no podemos afirmar si sería de clase 2 o clase 3.

El interés que presentan las mutaciones de clase 1 no solo reside en el hecho de que son las más frecuentes (60%) sino también porque serían susceptibles de ser recuperadas mediante el uso de chaperonas, que facilitando su plegamiento les permitieran salir del RE para seguir haciendo su función. La propuesta de esta tesis ha sido identificar redes moleculares y génicas alteradas de forma específica o general en la enfermedad de Dent que



nos permitan entender las bases fisiopatológicas de la enfermedad a nivel celular facilitando, de ese modo, la identificación de posibles dianas terapéuticas para bloquear la progresión de la enfermedad.

## 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MODELOS CELULARES CON MUTACIONES EN EL GEN *CLCN5* A TRAVÉS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue identificar los cambios a nivel transcripcional asociados al silenciamiento de *CLCN5*. El análisis de la expresión génica mediante microarrays demostró que el silenciamiento del gen *CLCN5* alteró la expresión de 1563 genes. Es interesante destacar que la re-introducción de CLC-5 WT en células previamente silenciadas por *CLCN5* revertía total o parcialmente los cambios en la expresión de 381 de los 1563 genes previamente modificados por el silenciamiento de *CLCN5*. Además, estos experimentos de rescate de la expresión de CLC-5 muestran que el efecto en la expresión génica inducido por el silenciamiento era específico y no debidos efectos “off-targets”.

En el túbulo proximal se reabsorben aproximadamente dos terceras partes de agua, sodio, fosfato, así como todo el bicarbonato, calcio, azúcares, aminoácidos y péptidos filtrados. Las mutaciones que provocan la pérdida de función del antiportador CLC-5 provocan PBPM, hipercalciuria y nefrocalcinosis, nefrolitiasis e insuficiencia renal progresiva<sup>54,55,69,70</sup>. En nuestros resultados observamos que el silenciamiento de *CLCN5* provoca un impacto significativo en algunos de los genes que regulan estos procesos. A continuación, se discute el posible rol de alguno de estos genes en la enfermedad de Dent.

La característica más común de esta patología es la pérdida masiva de PBPM, entre las que se incluyen de  $\beta$ 2-microglobulina,  $\alpha$ 1-microglobulina, o proteína de unión al retinol, producida por un deterioro en el proceso de reabsorción del túbulo proximal del riñón<sup>54</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, el silenciamiento de *CLCN5* provocó una disminución en la capacidad endocítica de las células RPTEC/TERT. Este efecto podría ser debido

a cambios a nivel transcripcional en los receptores megalina/cubilina. Sin embargo, en nuestro modelo, el silenciamiento de *CLCN5* no provocó ningún efecto en los niveles de expresión de estos genes. En este sentido, en estudios previos en ratones ratón KO para *CLCN5*, tampoco se observaron cambios a nivel de mRNA en el receptor megalina<sup>155</sup>. Por el contrario, el silenciamiento del gen *CLCN5* provocó una reducción significativa de la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) que podría también explicar la presencia de proteínas de bajo molecular en la orina de los pacientes Dent<sup>80,98,156</sup>.

El silenciamiento de *CLCN5* también provocó una reducción en el gen *ATP6V1C1*, que codifica para la subunidad C1 de la V-ATPasa. Este resultado es especialmente interesante considerando que la V-ATPasa es la responsable de la acidificación endosomal y funciona acoplada al CLC-5<sup>10-13</sup>. Además, *ATP6V1C1* fue uno de los genes cuya expresión revertía al reintroducir el CLC-5 WT en células previamente silenciadas. Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de *CLCN5* en células IRPTC (de sus siglas en inglés, Immortalized rat proximal tubule cell) provocó una disminución de la subunidad B2 de la V-ATPasa<sup>157</sup>. Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que CLC-5 tiene un papel en la regulación de la actividad de la V-ATPasa a través de la modulación de los niveles de expresión de sus subunidades.

Otro de los genes cuya expresión se vio disminuida por el silenciamiento de CLC5 y que podría tener un efecto en la capacidad endocítica de las células RPTEC fue el gen *ATP1B1*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la bomba sodio-potasio. Esta enzima se encuentra principalmente en la membrana plasmática, donde regula el transporte de sodio y potasio. Sin embargo, esta proteína también se ha encontrado presente en la membrana de los endosomas<sup>27</sup>, donde podría tener un papel

clave en el mantenimiento de electroneutralidad, una propiedad imprescindible para la acidificación de dicho compartimiento.

En cuanto a genes implicados en el transporte de fosfato, el silenciamiento de *CLC5* provocó una disminución en la expresión del transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo IIb (*SLC34A2*), pero no observamos ningún cambio en el transportador *Slc34a1* (*Npt2a*), a pesar de que en estudios previos en modelos de ratón KO para *CLCN5* se observó una disminución de dicho gen en la corteza renal en comparación con WT<sup>90</sup>. De todas formas, la disminución de los niveles de *SLC34A2* podrían en parte explicar el defecto en la reabsorción de fosfato que experimentan los pacientes con enfermedad de Dent<sup>69</sup>.

En cuanto a genes relacionados con el metabolismo del calcio, el silenciamiento de *CLC-5* produjo una disminución en la regulación en los genes *PTH1R* y *TRPV2*. El gen *PTH1R* codifica para el receptor de la hormona paratiroidea 1 y se expresa en los riñones y los huesos<sup>158</sup>. Existen estudios que demuestran que mutaciones en el gen *PTH1R* conducen a hipercalcemia crónica e hipercalciuria<sup>159</sup>. De igual forma, ratones deficientes en *PTH1R* exhibían hipercalciuria y tenían niveles de calcio en suero más bajos<sup>160</sup>. Por otro lado, el gen *TRPV2* pertenece a la familia de los canales TRP (de sus siglas en inglés, Transient Receptor Potential Cation Channels). En este sentido, se ha descrito que la desregulación de *TRPV6* causada por mutaciones en *CLCN5* podría contribuir al desarrollo de hipercalciuria en la enfermedad de Dent<sup>126</sup>. Por lo tanto, no sería de extrañar que mutaciones en *CLC-5* también pudieran inducir hipercalciuria a través de la modulación de *TRPV2*

El silenciamiento de *CLCN5* también provocó una disminución de la expresión en genes involucrados en el transporte mediado por vesículas, tales como *Rab27b* y *Rab3D*. Estudios previos sugieren que *Rab27b* desempeña un papel clave en la orientación de vesículas a la membrana plasmática apical de

las células uroteliales, además de promover la unión al citoesqueleto de estas células, cumpliendo así un doble papel estructural y regulador<sup>161</sup>. Por otro lado, estudios previos han atribuido un papel en la secreción regulada al gen Rab3D<sup>162</sup>. Por lo tanto, la disminución en estos genes podría contribuir a los defectos observados en el tráfico de los receptores y transportadores apicales.

También hemos observado una desregulación de los genes gen CDH1 y CDH3, que corresponden a subtipos de cadherinas. Las cadherinas desempeñan un papel clave en el establecimiento y mantenimiento de la adhesión intercelular, la polaridad celular y la arquitectura del tejido, y se expresan en casi todas las células epiteliales, incluidas las células del túbulo renal. Estudios previos han descrito que la desregulación de CDH1 junto con la lesión de las células renales, causada por cristales de oxalato, puede contribuir al desarrollo de nefrolitiasis<sup>163</sup>. Es más, el análisis del transcriptoma completo de un modelo de fibrosis renal inducida por UUO (de sus siglas en inglés, unilateral ureteral obstruction) en ratón reveló que CDH3 se encuentra entre los nuevos genes asociados a la fibrosis<sup>164</sup>.

El silenciamiento en *CLCN5* también produce una importante disminución en los niveles de expresión de SLPI. Estudios previos han demostrado que SLPI tiene un papel protector en las células renales epiteliales y favorece la actividad inmunosupresora al disminuir la proliferación de células linfocitarias<sup>165</sup>. El silenciamiento también provoca una disminución en los niveles de mRNA del gen *MUC1*, que codifica para la mucoproteína 1. Interesantemente se ha descrito que la mucina 1 es esencial tanto para la función renal normal como para la recuperación de una lesión<sup>166</sup>. Curiosamente *MUC1* también se redujo en pacientes con nefrolitiasis de calcio, lo que sugiere que *MUC1* podría tener un papel en la reabsorción de

calcio<sup>166</sup>. La desregulación de estos dos genes podría, por lo tanto, tener un papel clave en el desarrollo de la Enfermedad de Dent.

En resumen, hemos demostrado que hay numerosos cambios en la expresión génica producidos por el silenciamiento de *CLCN5* en las células del túbulo proximal, y que, en muchos casos, la re-introducción de *CLCN5* WT restablecía los efectos producidos por la ausencia de *CLCN5*. De forma específica, hemos identificado cambios en los niveles de expresión de genes que podrían explicar algunos de los efectos fisiopatológicos que se producen en la enfermedad de Dent.

La mutación p.V523del fue la mutación que provocó un mayor cambio en el perfil de expresión génica respecto a la forma wild-type en el modelo RPTEC/TERT. Esta mutación ha sido descrita en sólo tres pacientes en todo el mundo y sólo uno de ellos muestra unas características clínicas de la enfermedad de elevada gravedad. Aunque debido al reducido número de pacientes que presentan esta mutación es difícil establecer una correlación con la severidad clínica, la mutación p.V523del podría estar relacionada con un fenotipo más agresivo. En este sentido, el fuerte impacto sobre la expresión génica observado en nuestro modelo celular apoyaría esta hipótesis.

La mutación p.V523del provocó un aumento en la expresión de los genes *NR1H4* y una reducción de la expresión de *ADAMTS9*. Estudios previos demostraron que la activación del este gen reprimió la formación de los cilios<sup>167</sup>. Avances recientes revelan que los cilios están relacionados con el ciclo celular, citoesqueleto, la proteostasis y procesos de señalización<sup>168</sup>. El gen *ADAMTS9* se ha identificado como un regulador de la ciliogénesis, estudios previos han demostrado que una inactivación en dicho gen puede provocar una detención en este proceso<sup>169</sup>. La desregulación de estos dos genes podría, por lo tanto, tener un papel clave en el desarrollo de la Enfermedad de Dent.

También hemos observado un impacto en la expresión de los genes ATP13A2, MAP1B, CDH1, MUC 1 y Slc27a2. La expresión del gen ATP13A1, que codifica para una ATPasa, se vio disminuida por la re-introducción de la mutación V523del. Estudios previos han demostrado que la expresión de ATP13A2 protege contra la toxicidad del manganeso y el níquel, además del estrés proteasómico, mitocondrial y oxidativo<sup>170</sup>. La desregulación de este gen podría contribuir al daño renal observado en los pacientes con la enfermedad de Dent. Respecto a la expresión del gen MAP1B se vio disminuida en este mutante, este gen codifica para una proteína asociada a microtúbulos. Estudios en cerebro demuestran que MAP1B tiene un papel en la endocitosis en los receptores AMPA<sup>171</sup>. Aunque se desconoce el papel de este gen en riñón, el impacto de la mutación p.V523del en el gen MAP1B podría explicar los defectos observados en el proceso de endocitosis.

La mutación p.V523del al igual que el silenciamiento provocó a una disminución en los genes CDH1 y MUC1. Como ya se mencionó anteriormente, se ha descrito que una desregulación del gen CDH1 junto con la lesión de las células renales, causada por cristales de oxalato, puede contribuir al desarrollo de nefrolitiasis<sup>163</sup>. Por otro lado, la presencia de la mucina 1 es esencial tanto para la función renal normal como para la recuperación de una lesión<sup>166</sup>, además se le atribuye un papel en la reabsorción de calcio<sup>166</sup>.

La expresión génica de Slc27a2 se vio aumentada en presencia de la mutación p.V523del. Este gen codifica para un transportador transmembrana de ácidos grasos-2 (FATP2) que se expresa en las células del túbulo proximal. Este transportador media la captación de ácidos grasos libres no esterificados. Estos ácidos grasos libres no esterificados circulan por el plasma unidos a la albúmina. Existen estudios que demuestran que la acumulación de lípidos puede desencadenar disfunción renal<sup>172</sup>. Por lo tanto, esta up-regulación del transportador FATP2 podría explicar la progresión de la ERC en pacientes con

la Enfermedad de Dent<sup>173</sup>. Este gen podría considerarse un “target” para la prevención de la progresión de la ERC.

La re-introducción de la mutación p.V523del provocó un impacto en el gen *Slc3a1* y *SLC17A*. El gen *Slc3a1* codifica para un transportador responsables de la reabsorción de los aminoácidos. La des-regulación de este tipo de transportador podría explicar la pérdida de aminoácidos que desarrollan algunos pacientes con la enfermedad de Dent<sup>80</sup>. Respecto al gen *SLC17A* es curioso observar que, mientras que el silenciamiento de *CLC-5* producía una disminución en el cotransportador de fosfato dependiente de sodio humano tipo 1 (*NPT1*), que podría explicar en parte el defecto en la reabsorción de fosfato que experimentan los pacientes con enfermedad de Dent<sup>69</sup>, la mutación p.V523del indujo una up-regulación de este transportador. Esta aparente contradicción se podría explicar por el hecho de que se ha identificado que este cotransportador también funciona como transportador de excreción de urato en riñón<sup>174</sup>. Por lo tanto, la up-regulación de *NPT1* podría ser un mecanismo compensatorio para eliminar el ácido úrico en sangre, ya que la acumulación de este puede generar nefrolitiasis.

En resumen, hemos demostrado que la mutación p.V523del es la mutación que más cambios produce en la expresión génica. Hemos identificados cambios en los niveles de expresión de genes que podrían explicar el fenotipo más severo que experimenta este paciente.

El análisis de la expresión génica mediante microarrays demostró que la re-introducción de la mutación p.E527D en una línea previamente silenciada para *CLCN5* provocó una modificación en la expresión de 510 genes.

El impacto de esta mutación provocó una reducción en la expresión del gen *Slc7a11*, que codifica para un transportador de aminoácidos<sup>175</sup>. La desregulación de este transportador podría atribuirse a la pérdida de estos



aminoácidos por la orina. La aminociduria es una manifestación clínica que desarrollan algunos pacientes Dent. De la misma forma que en el silenciamiento de *CLCN5*, provocó una reducción del transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo IIb (SLC34A2), esta reducción se traduce en una disminución de la proteína transportadora, podría contribuir a la disminución de la absorción de sodio y fosfato de los túbulos proximales. De igual forma que la mutación p.V523del, la mutación p.E527D indujo una up-regulación de gen *SLC17A*. Como ya se ha mencionado anteriormente, la up-regulación de *NPT1* podría ser un mecanismo compensatorio para eliminar el ácido úrico en sangre, ya que la acumulación de este puede generar nefrolitiasis.

La mutación p.E527 al igual que la mutación p.V523 del provocó una reducción en la expresión de *ADAMTS9*. Como ya se mencionó anteriormente, El gen *ADAMTS9* se ha identificado como un regulador de la ciliogénesis. Curiosamente, mientras que la mutación p.V523del provocó un aumento en la expresión del gen *NR1H4*, que podría explicar la represión en la formación de cilios<sup>167</sup> comprometiendo procesos relacionados con el ciclo celular, citoesqueleto, la proteostasis y procesos de señalización<sup>168</sup>. La mutación p.E527D provocó una disminución de este gen. Por lo tanto, la down-regulación de *NR1H4* podría ser un mecanismo compensatorio.

La re-introducción de la mutación p.E527D provocó una disminución la expresión del gene *CPT1a*. El gen *CPT1* codifica para una enzima involucrada en la oxidación de ácidos grasos. Como se ha comentado anteriormente, existen estudios que demuestran que la acumulación de lípidos puede desencadenar disfunción renal<sup>172,176</sup>. Existen estudios que demuestran que la regulación negativa de *CPT1a* protege contra las células epiteliales intubulares de fibrosis<sup>176</sup>. Por lo tanto, este efecto protector podría atribuirse a una ganancia de función respecto a la ausencia de proteína. Curiosamente, en esta mutación observamos un aumento en la expresión del gen *HAVCR1*. Este gen

codifica para el receptor del virus de la hepatitis A-1 (hHAVcr-1) también conocido como KIM-1 (del inglés, Kidney Injure molecule) y está descrito como marcador de diagnóstico para lesión renal aguda<sup>177,178</sup>.

En resumen, hemos demostrado que hay numerosos cambios en la expresión génica producidos por la mutación p.E527D en las células del túbulo proximal, y que, en muchos casos, podrían explicar algunos de los efectos fisiopatológicas que se producen en la enfermedad de Dent.

La mutación p.I524KI fue la condición que exhibió un menor cambio en los niveles de expresión génica respecto a la forma wild-type. Este análisis mostró que esta mutación sólo modulaba la expresión de 32 genes, de los cuales 26 estaban up-regulados y 6 down-regulados. Este último hecho resulta un poco inexplicable ya que cabría esperar que los mutantes de clase 1 produjeran un mayor cambio en la expresión génica.

La re-introducción de la mutación p.I524K provocó una disminución de la expresión del transportador Slc38A. Este gen codifica para un transportador de aminoácidos<sup>179,180</sup>. Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de aminoácidos en la orina es una manifestación que pueden presentar algunos pacientes con la enfermedad de Dent. Esta mutación, de igual forma que el silenciamiento y la mutación p.V523del, también se observa una disminución en la expresión del gen CDH1.

La mutación p.I524K provocó un aumento en la expresión génica de genes relacionados con cáncer, tales como STEAP1, PREX1, PLAG1. Estudios previos indicaron que la sobre expresión del gen STEAP1 promueve la proliferación, migración, invasividad y tumorigenicidad del cáncer gástrico. En la actualidad no existen trabajos que relacionen este gen con riñón. La re-introducción de la mutación p.I524K también provocó un aumento de

expresión PREX1. Este gen también tiene un papel importante en la migración de melanoblastos y la progresión del cáncer a metástasis en ratones y humanos<sup>181</sup>. También observamos una sobreexpresión de PLAG1, estudios previos demuestran que la up-regulación de este gen induce el crecimiento de células tumorales en los tumores de Wills *in vitro* e induce el crecimiento neoplásico en el riñón de ratón. El tumor de Wills es el cáncer pediátrico más frecuente<sup>182</sup>.

En resumen, existen pocos cambios a nivel génico que nos puedan explicar como está mutación contribuye al fenotipo observado en los pacientes de Dent. También esta mutación provoca una modulación en genes relacionados con cáncer.

En análisis de los elementos compartidos entre todas las mutaciones de estudio (p.V523del, p. E527D y p.I524K) nos reveló que sólo 5 genes variaban su expresión en todas las condiciones. Cabría esperar que si estos genes se modulan de forma común en todas las mutaciones es porque equivaldrían al silenciamiento de *CLCN5*. Es importante destacar que sólo el gen que se ve afectado por el silenciamiento es PREX1, lo que podría sugerir que los cuatro genes restantes podrían suponer una ganancia de función respecto a la ausencia de proteína. El gen PREX1, como se ha comentado anteriormente, está implicado en la migración de melanoblastos y la progresión del cáncer a metástasis en ratones y humanos<sup>181</sup>. En gen ZRANB3 presenta actividad endonucleasa y de unión al DNA, la presencia de este gen es esencial para para estabilizar las horquillas de replicación<sup>183</sup>. También observamos una sobreexpresión de PLAG1, en todas las mutaciones, como ya se ha comentado anteriormente la up-regulación de este gen induce el crecimiento de células tumorales en los tumores de Wills *in vitro* e induce el

crecimiento neoplásico en el riñón de ratón<sup>182</sup>. El gen *LIN54* forma parte del complejo DREAM, un regulador esencial de los genes del ciclo celular.

### 3 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS INTERACCIONES PROTEICAS CON LA PROTEÍNA CLC-5 WT Y MUTADA

La identificación de nuevas interacciones de CLC-5 con proteínas cuya función es conocida puede ayudar a esclarecer en gran medida el papel exacto de CLC-5 en las células del túbulo proximal. Es más, identificar la función de las proteínas que interactúan de forma común o bien específicamente con el CLC-5 wild-type y/o mutado podría ayudar a entender mejor los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Dent. En este sentido, la identificación de nuevos componentes asociados a CLC-5 que pudieran formar parte del macrocomplejo involucrado en la vía endocítica, permitiría identificar potenciales dianas terapéuticas con el objetivo de revertir la capacidad endocítica en pacientes de Dent.

Cada vez existen más indicios de que interacciones en el extremo c-terminal de canales iónicos y transportadores con otras proteínas podrían ser críticas para la realización de muchas de sus funciones asociadas a la membrana plasmática. Entre estas funciones se incluyen la regulación del tráfico de proteínas hacia el endosoma, así como su reciclaje <sup>41,184–186</sup>, la

formación de complejos con proteínas que se encuentran ancladas al citoesqueleto<sup>42</sup> o bien conferir especificidad espacial para la transducción de señales<sup>187</sup>. Estudios previos demuestran que CLC-5 participa en varias interacciones proteína-proteína, todas ellas a través de su extremo carboxilo terminal.. Así, entre los interactores ya descritos encontramos entre otras las proteínas Nedd 4-2<sup>40</sup>, KIF3B<sup>43</sup> o NHERF2<sup>39</sup>. Estas interacciones han resultado esenciales para la regulación de la reabsorción de albúmina en los modelos estudiados. Otros, como la interacción de CLC-5 con cofilina, regulan la despolimerización del citoesqueleto de actina para mediar la gemación de endosomas nacientes.<sup>42</sup>.

Resulta un poco sorprendente que en este trabajo no hemos validado ninguna de las interacciones anteriormente descritas, o como mínimo, ninguna de estas interacciones ha aparecido en nuestros resultados entre las interacciones con mayor relevancia. Esta aparente contradicción podría ser debida a los distintos modelos y metodologías utilizados. Así, muchas de las interacciones anteriormente descritas fueran identificadas mediante ensayos de doble-híbrido o en modelos celulares menos próximos al túbulo proximal humano diferenciado como son las células HEK-293, OK y células epiteliales de cerdo (LLC-PK1).

En este trabajo hemos identificado 14 nuevas interacciones con la proteína CLC-5 WT. Estas proteínas interactúan preferentemente con la forma wild-type y dejan de hacerlo o lo hacen en menor medida con las formas mutantes, por lo que podrían tener especial relevancia en las funciones o procesos que desempeña CLC-5 en las células del túbulo proximal en condiciones no patológicas. Entre estas nuevas interacciones proteicas encontramos proteínas relacionadas con procesos de glicosilación o transporte entre otras. A continuación, se describe brevemente estas proteínas y su potencial vínculo con la Enfermedad de Dent:

- Entre las implicadas en glicosilación encontramos DDOST, GALNT1, MLEC, RPN1. La proteína DDOST forma parte de un complejo oligosacaryltransferasa (OST) que cataliza la transferencia de oligosacáridos con alto contenido en manosa a residuos de asparagina en polipéptidos nacientes en RE. El producto de este gen también está implicado en el procesamiento de productos finales de glicación avanzada (AGE, de sus siglas en inglés Advanced glycation end products), que se forman a partir de reacciones no enzimáticas entre azúcares y proteínas o lípidos y están asociadas con el envejecimiento y la hiperglucemia<sup>188</sup>. GALNT1 es una enzima relacionada con el proceso de O-glicosilación<sup>189</sup> que se expresa en muchos tejidos. Se ha descrito que el proceso de O-glicosilación influye en la composición de la matriz extracelular, respuesta al estrés de ER, señalización celular y en la proliferación celular<sup>190</sup>. Respecto a la malectina es una proteína de unión a carbohidratos del retículo endoplásmico y está relacionada con procesos de N-glicosilación<sup>191</sup>. La proteína riboforina I, localizada en RE, forma parte de un complejo oligosacaryl transferasa (OST) y participa en proceso de glicosilación de las proteínas. El estado de glicosilación de una proteína a menudo refleja su progresión a través de los compartimentos biosintéticos del RE y del aparato de Golgi<sup>145,146</sup>. Las proteínas que se encuentran en el proceso de glicosilación se consideran inmaduras, ya que no poseen las modificaciones complejas que se producen por la adición de monosacáridos en el aparato de Golgi<sup>145,146</sup>. El hecho de que estas proteínas interactúen de forma preferente con la forma WT respecto a las formas mutantes podría estar indicando que el estado de glicosilación de la proteína CLC5 es clave para su correcto funcionamiento y que las diferentes mutaciones podrían estar afectando el patrón de glicosilación y por tanto su función.

- Entre las proteínas involucradas en transporte encontramos las proteínas Sec22b y Sly1, que corresponden a una proteína SNARE (derivado de su nombre en inglés SNAP, *Soluble NSF Attachment Protein*) y una proteína asociada a SNARE, respectivamente. Las proteínas SNARE son un grupo de proteínas cuyo papel es facilitar la difusión de las vesículas, encargadas del transporte de moléculas necesarias para el funcionamiento de las células, con los compartimentos celulares apropiados. En concreto estas proteínas desempeñan una función de tráfico entre el RE y el aparato de Golgi<sup>192,193</sup>. Otra nueva interacción que hemos descrito y que podría ser relevante para el proceso de endocitosis es la proteína SCAMP2. Las proteínas SCAMP se encuentran principalmente en la red trans-Golgi (TGN) y en los endosomas de reciclaje y se ha demostrado que juegan un papel en la endocitosis<sup>194</sup> y la exocitosis<sup>195,196</sup>. El hecho de que estas proteínas interactúen en menor medida con las formas mutantes de CLC-5, como indican nuestros resultados, podrían conllevar defectos en el transporte hacia el aparato de Golgi. Al no llegar al Golgi, las proteínas mutantes no podrían completar las modificaciones post-traduccionales que si se dan en la forma WT. En la misma línea encontramos la proteína nicastrina, involucrada en transporte, y que se localiza en RE, aparato de Golgi y en la membrana lisosómica<sup>197</sup>, expresándose en cerebro y neuronas en cultivo<sup>198</sup>. En la actualidad se han publicado trabajos que relacionan esta proteína con procesos de endocitosis y la enfermedad de Alzheimer<sup>199–201</sup>. Se desconoce el papel que pueda tener esta proteína en el riñón, pero dada la función que se le atribuye en la patología de Alzheimer, el hecho de que esta proteína interactúe en menor medida



con las formas mutantes de CLC-5, podría conllevar defectos en el tráfico endocítico.

- La subunidad alfa de la proteína laminina es una glicoproteína de la membrana basal. Se ha descrito que tiene un papel crítico en la diferenciación de las células endoteliales glomerulares durante la glomerulogénesis<sup>202</sup>. En la actualidad, no hay información que relacione esta proteína con células del túbulo proximal, pero se podría hipotetizar que si las mutaciones provocan una interacción menor con esta proteína, esto podría conllevar defectos en la diferenciación de las células del túbulo proximal.
- El gen *Slc25a3* codifica para un transportador de fosfato mitocondrial, esencial para la producción de ATP. Se expresa de forma ubicua a lo largo de la vasculatura renal<sup>203</sup>. El riñón tiene un alto contenido mitocondrial y consumo de oxígeno<sup>204,205</sup>. Esto es especialmente relevante en los túbulos proximales, que contienen más mitocondrias que cualquier otra estructura en el riñón. La funcionalidad de las mitocondrias es fundamental para el funcionamiento adecuado del túbulo proximal. Existen evidencias de que la disfunción mitocondrial está involucrada en la fisiopatología de un amplio espectro de enfermedades renales, incluida la lesión renal aguda debido a la lesión por isquemia-reperfusión, el síndrome de Fanconi renal y los trastornos glomerulares<sup>206</sup>. El hecho de que las formas mutantes de CLC-5 interactúen en menor grado con el transportador de fosfato mitocondrial podría conducir a una disfunción mitocondrial o bien a una menor actividad mitocondrial que podría afectar a la capacidad de las células del túbulo proximal de funcionar a un alto rendimiento.

- El canal 2 selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC2) es una proteína que participa en el transporte de solutos a través de la membrana mitocondrial externa y está implicadas en la apoptosis, el transporte de metabolitos entre las mitocondrias y el citosol, el metabolismo energético y la regulación del volumen celular en las células somáticas<sup>207</sup>. También se han descrito interacciones de la proteína VDAC2 con proteínas del citoesqueleto, como por ejemplo, la proteína MAP-1<sup>208,209</sup>. Nuestros resultados sugieren que CLC-5 podría estar formando complejos con la proteína VDAC2, y, a través de esta, con proteínas del citoesqueleto. De esta manera, esta interacción podría ser importante para la estabilización del complejo endocítico o bien para el proceso de gemación de los endosomas a través de la despolimerización del citoesqueleto de actina, un proceso crítico para la endocitosis de albúmina<sup>39,40</sup>. El hecho que las formas mutantes de CLC-5 presenten una disminución de la interacción con esta proteína podría explicar en parte los defectos asociados con la endocitosis.
- La proteína tripeptidil peptidasa 1 (TPP1F) que es una proteasa ubicuapresente en diferentes tejidos tales como hígado, cerebro, riñón, pulmón y bazo<sup>210</sup> y que localiza en lisosoma y otros compartimentos vesiculares<sup>211,212</sup>. Estudios en *Dictyostelium* demuestran que TPP1F co-localizaba con la ATPasa vacuolar<sup>213</sup>. Considerando la localización de la proteína TPP1F en *Dictyostelium*, y la interacción con CLC-5 en las células de túbulo proximal, la proteína TPP1F podría ser un nuevo componente del complejo que forma CLC-5 con otras proteínas, tales como la V-ATPasa y los receptores megalina/cubilina.

- Las proteínas TMEM109 y Trans 2,3-enoyl-CoA reductasa se desconocen exactamente las funciones que desempeñan dentro de la célula, además, en la actualidad se desconoce si existe alguna relación entre las proteínas y el proceso de endocitosis.

En cuanto a proteínas que interactúan preferentemente con la forma de **CLC-5 mutada en Val523**, hemos identificado 5 nuevas interacciones que podrían en parte explicar las funciones o procesos que se ven afectados en las células RPTEC/TERT por la presencia de esta mutación. Entre estas interacciones encontramos, proteínas relacionadas con la endocitosis, la motilidad celular o con la formación de redes filamentosas en la matriz extracelular. A continuación, describimos brevemente estas 5 proteínas y su posible implicación en la etiopatogenia de la enfermedad de Dent.

- La proteína miosina 1c se localiza en la mayoría de los segmentos del túbulo, pero en las células del túbulo proximal se puede encontrar en el borde en cepillo<sup>214,215</sup>. Estudios anteriores la relacionan con la vía endocítica tardía, participando en la entrega del material endocitado para su degradación<sup>216,217</sup>. Otros estudios indican que miosina 1c estaría involucrada en el reciclaje de “lipid raft” desde el compartimento perinuclear de reciclaje hasta la superficie celular<sup>218</sup>. Estudios más recientes demuestran que la proteína miosina 1c regula la estabilidad dinámica de los contactos célula a célula basado en la E-cadherina<sup>219</sup>. El hecho de que CLC-5 pV523del pero no la forma wild-type interactúe con miosina 1c, podría conllevar una ganancia de función respecto la forma wild-type o la localización de CLC-5 en compartimentos sub-celulares donde no tendría que estar.

- la proteína RPL8 es un componente de la subunidad ribosómica 60S. En rata, participa en la unión del aminoacil-tRNA, un componente del sitio de unión del factor 2 situado en la interfaz de la subunidad ribosómica. Aunque se ha detectado expresión del gen RPL8 en modelos celulares de riñón como *Xenopus laevis* (A6), en la actualidad no se relaciona la expresión de esta proteína con el daño renal ni con procesos de endocitosis. Sin embargo, dada la función de RPL8 en la síntesis proteica, podríamos hipotetizar que la deleción de la valina 523 en CLC-5 podría modular de alguna manera la síntesis de alguna proteína que podría estar relacionada con la enfermedad de Dent.
- la proteína matrilina-2 está involucrada en la formación de redes filamentosas en la matriz extracelular<sup>220,221</sup>. Actualmente no existen trabajos que relacionen esta proteína con riñón ni con procesos de tráfico endocítico. En el campo de neurociencias, se ha asociado la regulación de esta molécula con lesiones inflamatorias axonales<sup>222</sup>.
- En relación a las proteínas BTBD11 y IVNS1ABP se desconoce la función que desempeñan y, por lo tanto, se desconoce si existe alguna relación entre estas proteínas y procesos patológicos en el riñón o el proceso de endocitosis.

En el caso de la forma mutante de CLC-5 con la **mutación p.I524K**, se identificaron 3 proteínas que presentaron un valor superior de interacción respecto a las otras formas de CLC-5. A continuación detallamos la información de la cual se dispone:

- La función de la proteína que codifica para el gen *ARMC9* se desconoce, pero las mutaciones en este gen causan el Síndrome de Joubert. Pacientes con este síndrome presentan enfermedad renal fibroquística. *ARMC9* se localiza en el cuerpo basal del cilio<sup>223</sup>. En este sentido, es interesante remarcar que la proteína que codifica para el

gen OCRL1, causante de la enfermedad de tipo 2, también se localiza en el cuerpo basal de los cilios y en el propio cilio<sup>224</sup>. Es importante destacar también que el cilio primario es un regulador clave del endocitosis apical ya que actúa como sensor del flujo en el túbulo.

- La proteína CNBP, es una proteína que se une a los ácidos nucleicos. CNBP está notablemente conservado entre los vertebrados y desempeña un amplio espectro de funciones en las células eucariotas<sup>225</sup>. Juega un papel crítico en el desarrollo del prosencéfalo al regular la proliferación celular y la apoptosis durante la organogénesis de vertebrados<sup>226</sup>. También se ha propuesto que el CNBP presenta actividad chaperona de los ácidos nucleicos a través de la unión, remodelación y estabilización de estructuras secundarias de los ácidos nucleicos<sup>225</sup>. Por lo tanto, la forma de CLC-5 p.I524K podría estar modulando la expresión de algunos genes a través de la interacción con CNBP, estabilizando estructuras secundarias de los ácidos nucleicos.
- La proteína que codifica para el gen TRIM25 funciona como una ubiquitina E3 ligasa y como una ISG15 E3 ligasa. Se han demostrado que TRIM25 es una nueva ubiquitina ligasa E3 de PPAR $\gamma$  (del inglés, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), conduciendo a su degradación dependiente de proteasoma<sup>227</sup>. Esta interacción preferente con TRIM25, podría ser resultado de que a forma mutada p.I524K presente una menor estabilidad o vida media que la proteína WT. De esta manera, a través de la unión a TRIM25, CLC-5 sería ubiquitinada para su posterior degradación en el retículo endoplasmático.

Para la forma mutante de CLC-5 portadora de la **mutación p.E527D** se han identificado 4 nuevas interacciones.

- La proteína que codifica para el gen *BCL10* promueve la apoptosis y activa la vía NF-kappa-B. A nivel del riñón, se ha descrito que BCL10 protege frente la albuminuria y el mantiene la integridad de los podocitos y la función renal<sup>228,229</sup>. La vía NFKB es una de las principales vías de señalización que regulan los procesos inflamatorios en el riñón. El hecho de que CLC-5 p.E527D interactúe con una proteína que activa esta vía podría estar indicando que la mutación de este residuo en CLC-5 podría desencadenar una respuesta inflamatoria en la célula del túbulo proximal, y, por extensión, al desarrollo de la fibrosis renal.
- La proteína LIMA1 es una proteína que se expresa principalmente en el intestino delgado donde se localiza en la membrana en borde en cepillo. Estudios previos atribuyen a LIMA1 un papel clave en la regulación de la absorción del colesterol intestinal<sup>230</sup>. Se desconoce el papel que pueda tener esta proteína en las células del túbulo proximal, pero el hecho de que se haya visto localizada en la membrana en borde en cepillo sugiere que podría tener un papel clave en procesos de absorción renal.
- A la proteína que codifica para el gen TACC3 se le atribuye un papel en la estabilización del huso mitótico y una adecuada alineación cromosómica<sup>231</sup>. Se ha descrito que también puede desempeñar un papel en el crecimiento y en la diferenciación de ciertas células cancerosas.

- La proteína TAF15 se une al DNA o RNA. El gen que codifica para esta proteína se transloca con frecuencia en sarcomas, cánceres epiteliales y hematopoyéticos raros. Analizando el perfil de expresión génica en estas patologías, se observó que el silenciamiento del gen *TAF15* provocó una inhibición en el crecimiento y un aumento en la apoptosis en células HeLa<sup>232</sup>.

Finalmente, hemos identificado un grupo de proteínas cuya interacción con CLC-5 **no se ve afectada por ninguna de las mutaciones** utilizadas en este estudio. A continuación, se discute la función de estas proteínas y su potencial implicación con el desarrollo de la enfermedad de Dent.

- La Arsénico 3 Metiltransferasa (AS3MT) es una de las enzimas involucradas en la transferencia de un grupo metilo de s-adenosil metionina a arsénico trivalente que se detecta en diferentes tejidos, tales como hígado, riñón, pulmón, corazón, glándula adrenal<sup>233</sup>. Como resultado de la reacción se generan una serie de metabolitos de arsénico metilado. Aunque la metilación se ha considerado comúnmente como una vía para la desintoxicación del arsénico y es un proceso crucial para la eliminación del arsénico por la orina<sup>234</sup>, da como resultado una acumulación de arsénico y esta puede contribuir al desarrollo de ERC<sup>233</sup>.
- Otra interacción importante para la regulación de la acidificación vesicular es con la proteína TMEM9. Estudios previos en cáncer, demostraron que esta proteína interactuaba con la V-ATPasa (ATPasa vacuolar), a través de la cual podría estar participando en la regulación de la acidificación vesicular<sup>235</sup>. Se ha demostrado que la unión entre ambas proteínas activa la señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina a través de

la degradación lisosómica de la poliposis coli adenomatosa (APC). Además, TMEM9 transactivado por  $\beta$ -catenina funciona como un regulador de retroalimentación positiva de la señalización de Wnt en el cáncer colorrectal. Como ya se ha descrito anteriormente, esta proteína junto con los receptores megalina/cubilina, el intercambiador NH3 y CLC-5 forman parte del complejo, que está presente en las membranas apicales de las células epiteliales del túbulo proximal, involucrado en el proceso de reabsorción.

- TMEM9B es una proteína que se localiza en las membranas del lisosoma y parcialmente en la membrana de los endosomas tempranos. Se ha descrito que la proteína TMEM9B es esencial en la activación de TNF de las vías NF- $\kappa$ B y MAPK<sup>236</sup>. Estos estudios han demostrado que TMEM9B es un componente clave de las vías de señalización inflamatoria y sugieren que los compartimentos endosómicos o lisosómicos regulan estas vías.
- Respecto a que detectemos la propia proteína CLC-5, es importante destacar que el análisis de la estructura tridimensional de proteínas CLC homólogas en bacterias sugiere que estas proteínas funcionan como homodímeros<sup>34</sup>. Por lo tanto, el hecho de que encontremos interacción con CLC5 en todas las condiciones sugiere que ninguna de las mutaciones estudiadas interfiere en la formación de dímeros.





# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES CON EL GEN CLCN5 SILENCIADO O CON LAS MUTACIONES EN CLC5 P.V523DEL, P.E527D E P.I524K. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMAS CLC-5 WT Y MUTADAS RE-INTRODUCIDAS EN CELULAS PREVIAMENTE SILENCIADAS:
2. Se han generado líneas celulares RPTEC/TERT silenciadas para el gen CLCN5 y portadoras de la forma wild-type o mutante de CLC-5. Estas últimas expresaban correctamente el CLC-5 exógeno a nivel de mRNA mientras mantenían el CLC-5 endógeno silenciado.
3. Las formas de CLC-5 portadoras de las mutaciones p.V523del, p.E527 y p.I524K presentaron niveles proteicos inferiores a la forma CLC-5 WT. Los niveles de proteína de las distintas formas no se correspondían con los del mRNA, sugiriendo mecanismos adicionales de regulación de los niveles de proteína.
4. Aunque la forma mutante de CLC\_5I524K presentó un peso molecular muy similar a las formas WT, p.V523del y p.E527D, esta presentó una vida media inferior al resto de formas, sugiriendo que este tipo de mutación podrían afectar a la correcta maduración de la proteína.
5. En este sentido, la proteína mutada I524K presentó un patrón de glicosilación ligeramente diferente al observado para las formas CLC-5 WT, p.V523del y p.E527D.
6. La proteína CLC-WT se localizó en retículo endoplasmático, endosoma primario y una pequeña fracción en membrana plasmática. Las formas mutantes de CLC-5 p.V523del y p.E527D se localizaron en retículo endoplasmático y endosoma primario. En base a esta localización, la mutación p.V523del podría considerarse de tipo 2 o 3, pero no de tipo 1. Por el contrario, el mutante de CLC-5 I524K mostró una localización

más restringida al retículo endoplasmático, acorde con su clasificación de tipo 1.

7. Tanto el silenciamiento de *CLCN5* como las mutaciones en CLC-5 estudiadas provocaron una drástica disminución de la captación de albúmina en células RPTEC/TERT.
8. El silenciamiento de *CLCN5* produjo un efecto muy leve en la captación de transferrina, sugiriendo la existencia de mecanismos de captación de transferrina independientes de CLC-5. Curiosamente, las mutaciones de CLC-5 p.V523del, p.E527D y p.I524K presentaron una mayor disminución de la captación de transferrina que el propio silenciamiento de CLC-5.
9. Los experimentos de competencia en endocitosis demostraron que el co-tratamiento de albumina marcada fluorescentemente con dosis 100 veces más altas de albumina no marcada no produjo una reducción total en la captación de albúmina en ninguna línea celular.
10. Los ensayos de endocitosis en presencia del inhibidor de la ATPasa V Bafilomicina A1 demostraron una reducción en la captación de albumina<sup>488</sup> no superiores a un 50%. Estos resultados, junto a los indicados en el punto 8, sugieren que la albumina podría estar entrando en la célula por otros mecanismos además del de la endocitosis mediada por receptor.

## 2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MODELOS CELULARES CON EL GEN *CLCN5* SILENCIADO O CON LAS MUTACIONES EN *CLC5* P.V523DEL, P.E527D E P.I524K MEDIANTE MICROARRAYS.

11. En células RPTEC/TERT, el silenciamiento de *CLCN5* modificó los niveles de expresión de 1563 genes. Estos genes podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad de Dent.
12. La mutación p.V523del en *CLC-5* es la mutación que provocó el cambios en los niveles de expresión de un mayor número de genes en comparación a la condición WT. Sorprendentemente, las células con la mutación pI524K en *CLC-5* fueron la línea celular que presentó un perfil de expresión génica más parecido a las células transducidas con la forma wild-type.
13. Para cada tipo de mutación en *CLC-5*, se han identificado genes que podrían estar implicados en la etiopatogenia de la enfermedad de Dent.
14. De igual forma, y cuando ha sido posible, se han realizado análisis de enriquecimiento funcional para identificar términos GO que pudieran estar sobre-representados en cada condición estudiada. Para las mutaciones p.V523del i p.E527D se han identificado términos GO que podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad de Dent.
15. En base a los criterios establecidos, solo 5 genes sufrieron cambios en sus niveles de expresión de forma común en todas las condiciones, es decir, que se vieron afectados por todas las mutaciones de *CLC-5* estudiadas.

### 3 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INTERACTORES PROTEICOS PARA CLC-5 WT Y CLC-5 CON MUTACIONES EN P.V523DEL, E527D E I524K.

16. Se han identificado 14 nuevas interacciones con la proteína CLC-5 WT mediante co-immunoprecipitación seguida de espectrometría de masas (MS). Estos nuevos interactores proteicos, en muchos casos de función conocida, podrían ayudar a comprender mejor el papel fisiológico de CLC-5 en la célula del túbulo proximal
17. Se han identificado 5 nuevas interacciones proteicas con la forma mutada de CLC-5 p.V523del, 4 nuevas interacciones proteicas con la forma mutada p.E527D y 3 nuevas interacciones proteicas con la forma mutada p.I524K. El análisis de las funciones de cada una de estas proteínas podría ayudar a entender mejor los mecanismos de desarrollo de la enfermedad de Dent.
18. Se ha validado la interacción de CLC-5 con TMEM9 mediante co-immunoprecipitación “reversa” seguida de Western Blot. Esta interacción es especialmente relevante ya que se ha descrito que TMEM9 se puede encontrar unida a la ATPasa V endosomal.



## Bibliografía

1. Guyton A, Hall J. Los líquidos corporales y los riñones. *Guyt y Hall Tratado Fisiol Médica*. 2010;12:1092. doi:10.1093/jhered/est132
2. Hernando Avedaño L. Hernando. *Nefrología Clínic*. 2013:954.
3. Tortora, G. J., & Derrickson B. *PRINCIPIOS DE ANATOMIA Y FISILOGIA (11a. Ed., 4a. Reimp.)*. Editorial Medica Panamericana.; 2010.
4. Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2009;458(6):1039-1048. doi:10.1007/s00424-009-0685-8
5. Madsen KM, Nielsen S TC. *The Kidney*. Saunders, Philadelphia; 2008.
6. Féraille E, Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. *Physiol Rev*. 2001;81(1):345-418. doi:10.1152/physrev.2001.81.1.345
7. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, et al. Loss of chloride channel CLC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8472-8477. doi:10.1073/pnas.1432873100
8. De S, Kuwahara S, Saito A. The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes (Basel)*. 2014;4(3):333-335. doi:10.3390/membranes4030333
9. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: From experimental models to human disease. *Kidney Int*. 2016;89(1):58-67. doi:10.1016/j.kint.2015.11.007
10. Jentsch TJ. *CLC Chloride Channels and Transporters: From Genes to Protein Structure, Pathology and Physiology*. Vol 43.; 2008. doi:10.1080/10409230701829110
11. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu Rev Biochem*. 1986;55(1):663-700. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
12. Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *FEBS Lett*. 1998;440(3):258-263. doi:10.1016/S0014-



5793(98)01425-2

13. Hara-Chikuma M, Wang Y, Guggino SE, Guggino WB, Verkman AS. Impaired acidification in early endosomes of ClC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(3):941-946. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.060
14. Devuyst O, Thakker R V. Dent ' s disease. *Orphanet J Rare Disease*. 2010;5(28):1-8.
15. Baines RJ, Brunskill NJ. The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria. *Nephron - Exp Nephrol*. 2008;110(2):67-71. doi:10.1159/000161982
16. Hryciw DH, Ekberg J, Pollock CA, Poronnik P. ClC-5: a chloride channel with multiple roles in renal tubular albumin uptake. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(7):1036-1042. doi:10.1016/j.biocel.2005.09.009
17. Lourdel S, Grand T, Burgos J, González W, Sepúlveda F V., Teulon J. ClC-5 mutations associated with Dent's disease: A major role of the dimer interface. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2012;463(2):247-256. doi:10.1007/s00424-011-1052-0
18. Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*. 1990;348(6301):510-514. doi:10.1038/348510a0
19. Jentsch TJ, Pusch M. CLC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease. *Physiol Rev*. 2018;98(3):1493-1590. doi:10.1152/physrev.00047.2017
20. Wellhauser L, D'Antonio C, Bear CE. ClC transporters: Discoveries and challenges in defining the mechanisms underlying function and regulation of ClC-5. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010;460(2):543-557. doi:10.1007/s00424-009-0769-5
21. Maduke M, Pheasant DJ, Miller C. High-level expression, functional reconstitution, and quaternary structure of a prokaryotic ClC-type chloride channel. *J Gen Physiol*. 1999;114(5):713-722. doi:10.1085/jgp.114.5.713
22. Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem*. 1996;271(52):33632-33638. doi:10.1074/jbc.271.52.33632

23. Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Golgi localization and functionally important domains in the NH<sub>2</sub> and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem*. 1998;273(24):15110-15118. doi:10.1074/jbc.273.24.15110
24. Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*. 1995;270(52):31172-31177. doi:10.1074/jbc.270.52.31172
25. Vandewalle A, Cluzeaud F, Peng KC, et al. Tissue distribution and subcellular localization of the CLC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2001;280(2 49-2):373-381. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.2.c373
26. Igarashi T, Günther W, Sekine T, et al. Functional characterization of renal chloride channel, CLCN5, mutations associated with Dent's(Japan) disease. *Kidney Int*. 1998;54(6):1850-1856. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00203.x
27. Sakamoto H, Sado Y, Naito I, et al. Cellular and subcellular immunolocalization of CLC-5 channel in mouse kidney: Colocalization with H<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1999;277(6 46-6):957-965. doi:10.1152/ajprenal.1999.277.6.f957
28. Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beauwens R, Thakker R V. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet*. 1999;8(2):247-257. doi:10.1093/hmg/8.2.247
29. Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. CLC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8075-8080. doi:10.1073/pnas.95.14.8075
30. Van Den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, et al. The loss of the chloride channel, CLC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology*. 2006;147(3):1287-1296. doi:10.1210/en.2005-1149
31. Picollo A, Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature*. 2005;436(7049):420-423. doi:10.1038/nature03720
32. Scheel O, Zdebik AA, Lourdel S, Jentsch TJ. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins.

- Nature*. 2005;436(7049):424-427. doi:10.1038/nature03860
33. Lloyd SE, Pearce SHS, Fisher SE, et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*. 1996;379(6564):445-449. doi:10.1038/379445a0
  34. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. 2002;415(6869):287-294. doi:10.1038/415287a
  35. Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science*. 2003;300(5616):108-112. doi:10.1126/science.1082708
  36. Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays*. 1997;19(6):469-479. doi:10.1002/bies.950190606
  37. Meyer S, Savaresi S, Forster IC, Dutzler R. Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter ClC-5. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(1):60-67. doi:10.1038/nsmb1188
  38. Schwake M, Friedrich T, Jentsch TJ. An Internalization Signal in ClC-5, an Endosomal Cl<sup>-</sup> Channel Mutated in Dent's Disease. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12049-12054. doi:10.1074/jbc.M010642200
  39. Hryciw DH, Ekberg J, Ferguson C, et al. Regulation of albumin endocytosis by PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) scaffolds: Interaction of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange regulatory factor-2 with ClC-5. *J Biol Chem*. 2006;281(23):16068-16077. doi:10.1074/jbc.M512559200
  40. Hryciw DH, Ekberg J, Lee A, et al. Nedd4-2 functionally interacts with ClC-5: Involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells. *J Biol Chem*. 2004;279(53):54996-55007. doi:10.1074/jbc.M411491200
  41. Reed AAC, Loh NY, Terryn S, et al. ClC-5 and KIF3B interact to facilitate ClC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: Relevance to pathophysiology of Dent's disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010;298(2):365-381. doi:10.1152/ajprenal.00038.2009
  42. Hryciw DH, Wang Y, Devuyst O, Pollock CA, Poronnik P, Guggino WB. Cofilin interacts with ClC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40169-40176. doi:10.1074/jbc.M307890200

43. Reed AAC, Loh NY, Terryn S, et al. CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: Relevance to pathophysiology of Dent's disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010;298(2):365-380. doi:10.1152/ajprenal.00038.2009
44. Wästfelt M, Fadeel B, Henter JI. A journey of hope: Lessons learned from studies on rare diseases and orphan drugs. *J Intern Med*. 2006;260(1):1-10. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01666.x
45. Devuyst O, Knoers NVAM, Remuzzi G, Schaefer F. Rare inherited kidney diseases: Challenges, opportunities, and perspectives. *Lancet*. 2014;383(9931):1844-1859. doi:10.1016/S0140-6736(14)60659-0
46. Soriano JR. Tubulopatías renales hereditarias: de la clínica a la biología molecular. 2003:NEFROLOGÍA. Vol. XXIII. Suplemento 1.
47. Dent CE, Friedman M. Hypercalcuric rickets associated with renal tubular damage. *Arch Dis Child*. 1964;39(205):240-249. doi:10.1136/adsc.39.205.240
48. SCRIVER CR, GOLDBLOOM RB, ROY CC. HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS WITH RENAL HYPER-GLYCINURIA, RENAL GLUCOSURIA, AND GLYCYL-PROLINURIA. A SYNDROME WITH EVIDENCE FOR RENAL TUBULAR SECRETION OF PHOSPHORUS. *Pediatrics*. 1964;34:357-371.
49. Hemady ISS and K. Hypercalciuric Rickets : a rare cause of Nephrolithiasis1. 1980;226:222-226.
50. Suzuki Y, Okada T. Asymptomatic low molecular weight proteinuria in children. *Acta Paediatr Jpn Overseas Ed*. 1990;32(6):696-700. doi:10.1111/j.1442-200x.1990.tb00907.x
51. Murakami T, Kawakami H, Matsuyama S, Terashima T, Karashima S, Hattori S. Asymptomatic low molecular weight proteinuria: studies in five patients. *Clin Nephrol*. 1987;28(2):93-98.
52. Suzuki Y. Asymptomatic low molecular weight proteinuria is a new entity? *Clin Nephrol*. 1995;43(1):70.
53. Wrong O, Norden A, Feest T. Dent's disease: a familiar renal tubular syndrome with hypercalciuria, tubular proteinuria, rickets, nephrocalcinosis and eventual renal failure. *Q J Medd*. 1990:1086-1087.
54. Wrong OM, Norden AG, Feest TG. Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive

- renal failure and a marked male predominance. *QJM*. 1994;87(8):473-493.
55. Frymoyer PA, Scheinman SJ, Dunham PB, Jones DB, Hueber P, Schroeder ET. X-linked recessive nephrolithiasis with renal failure. *N Engl J Med*. 1991;325 (10):681-686.
  56. Reinhart SC, Moses M, Frymoyer PA, et al. Characterization of Carrier females and Affected Males With X-Linked Recessive Nephrolithiasis. 1995:1451-1461.
  57. Enia G, Zoccali C, Bolino A, Romeo G. New X-linked hypophosphatemic rickets with hypercalciuria leading to progressive renal failure. *Nephrol Dial Transpl*. 1992;7:757-758.
  58. Igarashi T, Hayakawa H, Shiraga H, et al. Hypercalciuria and nephrocalcinosis in patients with idiopathic low-molecular-weight proteinuria in Japan: is the disease identical to Dent's disease in United Kingdom? *Nephron*. 1995;69(3):242-247. doi:10.1159/000188464
  59. Fisher SE, Van Bakel I, Lloyd SE, Pearce SHS, Thakker R V., Craig IW. Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics*. 1995;29(3):598-606. doi:10.1006/geno.1995.9960
  60. Lloyd SE, Pearce SHS, Günther W, et al. Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *J Clin Invest*. 1997;99(5):967-974. doi:10.1172/JCI119262
  61. Hoopes RR, Shrimpton AE, Knohl SJ, et al. Dent disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet*. 2005;76(2):260-267. doi:10.1086/427887
  62. Choudhury R, Noakes CJ, McKenzie E, Kox C, Lowe M. Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms. *J Biol Chem*. 2009;284(15):9965-9973. doi:10.1074/jbc.M807442200
  63. Ooms LM, Horan KA, Rahman P, et al. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J*. 2009;419(1):29-49. doi:10.1042/BJ20081673
  64. Lowe M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. 2005;6(9):711-719. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00311.x

65. Hodgin JB, Corey HE, Kaplan BS, D'Agati VD. Dent disease presenting as partial Fanconi syndrome and hypercalciuria. *Kidney Int.* 2008;73(11):1320-1323. doi:10.1038/sj.ki.5002785
66. Ludwig M, Utsch B, Monnens LAH. Recent advances in understanding the clinical and genetic heterogeneity of Dent's disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(10):2708-2717. doi:10.1093/ndt/gfl346
67. Hoopes RR, Shrimpton AE, Knohl SJ, et al. Dent Disease with Mutations in OCRL1. 2005:260-267.
68. Wu F, Reed AAC, Williams SE, et al. Mutational analysis of CLC-5, cofilin and CLC-4 in patients with dent's disease. *Nephron - Physiol.* 2009;112(4). doi:10.1159/000225944
69. Claverie-Martín F, Ramos-Trujillo E, García-Nieto V. Dent's disease: Clinical features and molecular basis. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(5):693-704. doi:10.1007/s00467-010-1657-0
70. Ludwig M, Utsch B. Dent disease-like phenotype and the chloride channel CLC-4 (CLCN4) gene. *Am J Med Genet.* 2004;128A(4):434-435. doi:10.1002/ajmg.a.30204
71. Scheinman SJ. X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: Clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int.* 1998;53(1):3-17. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00718.x
72. González-Lamuño D, García Fuentes M. Tubulopatías. *Pediatr Integr.* 2005;9(5):363-378. doi:10.1016/s1696-2818(08)74877-7
73. Cox JPD, Yamamoto K, Christie PT, et al. Dent ' s Disease. 1999;14(9):1536-1542.
74. Vezzoli G, Corghi E, Edefonti A, et al. Nonacidotic kidney proximal tubulopathy with absorptive hypercalciuria. *Am J Kidney Dis.* 1995;25(2):222-227. doi:10.1016/0272-6386(95)90002-0
75. Carballo-Trujillo I, Garcia-Nieto V, Moya-Angeler FJ, et al. Novel truncating mutations in the CLC-5 chloride channel gene in patients with Dent's disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(4):717-723. doi:10.1093/ndt/gfg016
76. Ludwig M, Utsch B, Balluch B, Fründ S, Kuwertz-Bröking E, Bökenkamp A. Hypercalciuria in patients with CLCN5 mutations. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(9):1241-1250. doi:10.1007/s00467-006-0172-9
77. Langlois V, Bernard C, Scheinman SJ, Thakker R V., Cox JPD, Goodyer PR. Clinical features of X-linked nephrolithiasis in childhood. *Pediatr*

- Nephrol.* 1998;12(8):625-629. doi:10.1007/s004670050516
78. Reinhart SC, Moses M, Frymoyer PA, et al. Characterization of Carrier With X-Linked Recessive and Affected of. 1995:1451-1461.
79. Hoopes J, Hueber PA, Reid J, et al. CLCN5 chloride-channel mutations in six new North American families with X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int.* 1998;54(3):698-705. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00061.x
80. Blanchard A, Curis E, Guyon-Roger T, et al. Observations of a large Dent disease cohort. *Kidney Int.* 2016;90(2):430-439. doi:10.1016/j.kint.2016.04.022
81. Akuta N, Lloyd SE, Igarashi T, et al. *Mutations of CLCN5 in Japanese Children with Idiopathic Low Molecular Weight Proteinuria, Hypercalciuria and Nephrocalcinosis.* Vol 52.; 1997. doi:10.1038/ki.1997.412
82. Frishberg Y, Dinour D, Belostotsky R, et al. Dent's disease manifesting as focal glomerulosclerosis: Is it the tip of the iceberg? *Pediatr Nephrol.* 2009;24(12):2369-2373. doi:10.1007/s00467-009-1299-2
83. Fischer AS, Marcussen N, Rasmussen M, Randers E. Two brothers with identical variants of the CLCN5 gene-one developing Dent's disease. *Clin Kidney J.* 2018;11(4):459-461. doi:10.1093/ckj/sfx123
84. Scheinman SJ, Cox JPD, Lloyd SE, et al. Isolated hypercalciuria with mutation in CLCN5: Relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int.* 2000;57(1):232-239. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00774.x
85. Bökenkamp A, Böckenhauer D, Cheong H II, et al. Dent-2 Disease: A Mild Variant of Lowe Syndrome. *J Pediatr.* 2009;155(1):94-99. doi:10.1016/j.jpeds.2009.01.049
86. Cebotaru V, Kaul S, Devuyst O, et al. High citrate diet delays progression of renal insufficiency in the CLC-5 knockout mouse model of Dent's disease. *Kidney Int.* 2005;68(2):642-652. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00442.x
87. Silva I V., Cebotaru V, Wang H, et al. The CLC-5 knockout mouse model of Dent's disease has renal hypercalciuria and increased bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):615-623. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.615
88. Sayer JA, Carr G, Simmons NL. Calcium phosphate and calcium oxalate crystal handling is dependent upon CLC-5 expression in mouse collecting duct cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.*

2004;1689(1):83-90. doi:10.1016/j.bbadis.2004.02.007

89. Sayer JA, Carr G, Simmons NL. Nephrocalcinosis: Molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci*. 2004;106(6):549-561. doi:10.1042/CS20040048
90. Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl<sup>-</sup> channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*. 2000;408(6810):369-373. doi:10.1038/35042597
91. Frymoyer PA, Scheinman SJ, Dunham PB, Jones DB, Hueber P SE. X-linked recessive nephrolithiasis with renal failure. *N Engl J Med*. 1991;325(3):681-686.
92. Moulin P, Igarashi T, Van Der Smissen P, et al. Altered polarity and expression of H<sup>+</sup>-ATPase without ultrastructural changes in kidneys of Dent's disease patients. *Kidney Int*. 2003;63(4):1285-1295. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00851.x
93. Wang X, Anglani F, Beara-Lasic L, et al. Glomerular pathology in dent disease and its association with kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(12):2168-2176. doi:10.2215/CJN.03710416
94. Copelovitch L, Nash MA, Kaplan BS. Hypothesis: Dent disease is an underrecognized cause of focal glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(5):914-918. doi:10.2215/CJN.00900207
95. Blanchard A, Vargas-Poussou R, Peyrard S, et al. Effect of Hydrochlorothiazide on Urinary Calcium Excretion in Dent Disease: An Uncontrolled Trial. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(6):1084-1095. doi:10.1053/j.ajkd.2008.08.021
96. Raja KA, Schurman S, D'Mello RG, et al. Responsiveness of hypercalciuria to thiazide in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(12):2938-2944. doi:10.1097/01.ASN.0000036869.82685.F6
97. Monroy A, Plata C, Hebert SC, Gamba G. Characterization of the thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter: A new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2000;279(1 48-1):161-169. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.1.f161
98. Lieske, J. C., Milliner, D. S., Beara-Lasic, L., Harris, P., Hopp, K., Cogal, A., & Mattison K (2012). Dent Disease. GeneReview.
99. Fisher SE, Black GC, Lloyd SE, et al. Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum Mol Genet*. 1994;3(11):2053-2059.



100. Ludwig M, Waldegger S, Nuutinen M, et al. Four additional CLCN5 exons encode a widely expressed novel long CLC-5 isoform but fail to explain dent's phenotype in patients without mutations in the short variant. *Kidney Blood Press Res.* 2003;26(3):176-184. doi:10.1159/000071883
101. Forino M, Graziotto R, Tosetto E, Gambaro G, D'Angelo A, Anglani F. Identification of a novel splice site mutation of CLCN5 gene and characterization of a new alternative 5' UTR end of CLC-5 mRNA in human renal tissue and leukocytes. *J Hum Genet.* 2004;49(1):53-60. doi:10.1007/s10038-003-0108-1
102. Mansour-hendili L, Blanchard A, Pottier N Le, et al. Mutation Update of the CLCN5 gene responsible for Dent disease 1. *Hum Mutat.* 2015;36(8):743-752. doi:10.1002/humu.22804.This
103. Morimoto T, Uchida S, Sakamoto H, et al. Mutations in CLCN5 chloride channel in Japanese patients with low molecular weight proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(5):811-818.
104. Ramos-Trujillo E, Claverie-Martin F, Garcia-Nieto V, et al. Dent's disease: Identification of seven new pathogenic mutations in the CLCN5 gene. *J Pediatr Genet.* 2013;2(3):133-140. doi:10.3233/PGE-13061
105. Ramos-Trujillo E, Garcia-Nieto V, Gonzalez-Acosta H, et al. Molecular analysis of the CLCN5 gene in Dent's disease: first mutation identified in a patient from South America. *Clin Nephrol.* 2007;68(6):367-372. doi:10.5414/cnp68367
106. García Nieto V, Claverie-Martín F. Enfermedad de Dent. Historia y causas genéticas de una «nueva» tubulopatía. *Nefrología.* 2003;23(3):195-199.
107. Besbas N, Ozaltin F, Jeck N, Seyberth H, Ludwig M. CLCN5 mutation (R347X) associated with hypokalaemic metabolic alkalosis in a Turkish child: An unusual presentation of Dent's disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1476-1479. doi:10.1093/ndt/gfh799
108. Grand T, Mordasini D, L'Hoste S, et al. Novel CLCN5 mutations in patients with dents disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney Int.* 2009;76(9):999-1005. doi:10.1038/ki.2009.305
109. Cheong H Il, Lee JW, Zheng SH, et al. Phenotype and genotype of Dent's disease in three Korean boys. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(4):455-459. doi:10.1007/s00467-004-1769-5

110. Tosetto E, Ghiggeri GM, Emma F, et al. Phenotypic and genetic heterogeneity in Dent's disease--the results of an Italian collaborative study. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2452-2463. doi:10.1093/ndt/gfl274
111. Wu F, Roche P, Christie PT, et al. Modeling study of human renal chloride channel (hCLC-5) mutations suggests a structural-functional relationship. *Kidney Int*. 2003;63(4):1426-1432. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00859.x
112. Gorvin CM, Wilmer MJ, Piret SE, et al. Receptor-mediated endocytosis and endosomal acidification is impaired in proximal tubule epithelial cells of Dent disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):7014-7019. doi:10.1073/pnas.1302063110
113. Ludwig M, Doroszewicz J, Seyberth HW, et al. Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: Implications for CLC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet*. 2005;117(2-3):228-237. doi:10.1007/s00439-005-1303-2
114. Smith AJ, Reed AAC, Loh NY, Thakker R V., Lippiat JD. Characterization of dent's disease mutations of CLC-5 reveals a correlation between functional and cell biological consequences and protein structure. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;296(2):390-397. doi:10.1152/ajprenal.90526.2008
115. D'Antonio C, Molinski S, Ahmadi S, Huan L-J, Wellhauser L, Bear CE. Conformational defects underlie proteasomal degradation of Dent's disease-causing mutants of CLC-5. *Biochem J*. 2013;452(3):391-400. doi:10.1042/BJ20121848
116. Grand T, L'Hoste S, Mordasini D, et al. Heterogeneity in the processing of CLCN5 mutants related to Dent disease. *Hum Mutat*. 2011;32(4):476-483. doi:10.1002/humu.21467
117. Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, et al. Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet*. 2000;9(20):2937-2945. doi:10.1093/hmg/9.20.2937
118. Luyckx VA, Leclercq B, Dowland LK, Yu ASL. Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(21):12174-12179. doi:10.1073/pnas.96.21.12174
119. Devuyst O, Jouret F, Auzanneau C, Courtoy PJ. Chloride channels and endocytosis: New insights from Dent's disease and CLC-5 knockout

- mice. *Nephron - Physiol.* 2005;99(3):69-73. doi:10.1159/000083210
120. Santo Y, Hirai H, Shima M, et al. Examination of megalin in renal tubular epithelium from patients with Dent disease. *Pediatr Nephrol.* 2004;19(6):612-615. doi:10.1007/s00467-004-1445-9
  121. Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, et al. Megalin antagonizes activation of the parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5620-5625. doi:10.1074/jbc.274.9.5620
  122. Norden AGW, Lapsley M, Lee PJ, et al. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney Int.* 2001;60(5):1885-1892. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00016.x
  123. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology.* 1999;140(5):2224-2231. doi:10.1210/endo.140.5.6691
  124. Guggino SE. Mechanisms of disease: What can mouse models tell us about the molecular processes underlying Dent disease? *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007;3(8):449-455. doi:10.1038/ncpneph0541
  125. Jentsch TJ. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: Emerging roles of CLC chloride transporters. *J Physiol.* 2007;578(3):633-640. doi:10.1113/jphysiol.2006.124719
  126. Na, T., Zhang, W., & Peng JB. Chloride channel ClC-5 linked to Dent's disease decreases protein level of the intestinal calcium entry channel TRPV6 in *Xenopus* oocytes. *FASEB Journal*, 23 (1\_MeetingAbstracts),. 2009:998-15.
  127. Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science (80- ).* 2010;328(5984):1398-1401. doi:10.1126/science.1188070
  128. Bergsdorf EY, Zdebik AA, Jentsch TJ. Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11184-11193. doi:10.1074/jbc.M901170200
  129. Accardi A, Walden M, Nguitragool W, Jayaram H, Williams C, Miller C. Separate ion pathways in a Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Gen Physiol.* 2005;126(6):563-570. doi:10.1085/jgp.200509417
  130. Zdebik AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, et al. Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J Biol Chem.*

2008;283(7):4219-4227. doi:10.1074/jbc.M708368200

131. Bignon Y, Alekov A, Frachon N, et al. A novel CLCN5 pathogenic mutation supports Dent disease with normal endosomal acidification. *Hum Mutat.* 2018;39(8):1139-1149. doi:10.1002/humu.23556
132. Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc.* 2019;14(1):68-85. doi:10.1038/s41596-018-0082-x
133. Reichel M, Liao Y, Rettel M, et al. In planta determination of the mRNA-binding proteome of arabidopsis etiolated seedlings. *Plant Cell.* 2016;28(10):2435-2452. doi:10.1105/tpc.16.00562
134. Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2008;295(5):1365-1375. doi:10.1152/ajprenal.90405.2008
135. Jouret F, Igarashi T, Gofflot F, et al. Comparative ontogeny, processing, and segmental distribution of the renal chloride channel, ClC-5. *Kidney Int.* 2004;65(1):198-208. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00360.x
136. Wu W, Rychkov GY, Hughes BP, Bretag AH. Functional complementation of truncated human skeletal-muscle chloride channel (hClC-1) using carboxyl tail fragments. *Biochem J.* 2006;395(1):89-97. doi:10.1042/BJ20050966
137. Schmidt-Rose T, Jentsch TJ. Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20515-20521. doi:10.1074/jbc.272.33.20515
138. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 1994;45(1):48-57. doi:10.1038/ki.1994.6
139. Lloyd SE, Gunther W, Pearce SH, et al. Characterisation of renal chloride channel, CLCN5, mutations in hypercalcaemic nephrolithiasis (kidney stones) disorders. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1233-1239. doi:10.1093/hmg/6.8.1233
140. Lin Z, Jin S, Duan X, et al. Chloride channel (Clc)-5 is necessary for exocytic trafficking of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 (NHE3). *J Biol Chem.* 2011;286(26):22833-22845. doi:10.1074/jbc.M111.224998

141. Wang Y, Cai H, Cebotaru L, et al. ClC-5: Role in endocytosis in the proximal tubule. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2005;289(4 58-4):850-862. doi:10.1152/ajprenal.00011.2005
142. Rickheit G, Wartosch L, Schaffer S, et al. Role of ClC-5 in renal endocytosis is unique among ClC exchangers and does not require PY-motif-dependent ubiquitylation. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17595-17603. doi:10.1074/jbc.M110.115600
143. Jouret F, Igarashi T, Gofflot F, et al. Comparative ontogeny, processing, and segmental distribution of the renal chloride channel, ClC-5. *Kidney Int*. 2004;65(1):198-208. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00360.x
144. Silberstein S, Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1996;10(8):849-858.
145. Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:27-54. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.27
146. Hebeisen S, Biela A, Giese B, Muller-Newen G, Hidalgo P, Fahlke C. The role of the carboxyl terminus in ClC chloride channel function. *J Biol Chem*. 2004;279(13):13140-13147. doi:10.1074/jbc.M312649200
147. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. 2001;291(5512):2364-2369. doi:10.1126/science.291.5512.2364
148. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 1990;63(4):827-834. doi:10.1016/0092-8674(90)90148-8
149. Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA, Shyng SL. Defective trafficking and function of KATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2882-2887. doi:10.1073/pnas.051499698
150. Tenten V, Menzel S, Kunter U, et al. Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(12):1966-1980. doi:10.1681/ASN.2013010018
151. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal

- tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282(2):F358-F365. doi:10.1152/ajprenal.0164.2001
152. Smith CP, Lee WK, Haley M, Poulsen SB, Thévenod F, Fenton RA. Proximal tubule transferrin uptake is modulated by cellular iron and mediated by apical membrane megalin-cubilin complex and transferrin receptor 1. *J Biol Chem*. 2019;294(17):7025-7036. doi:10.1074/jbc.RA118.006390
  153. Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: Transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):401-406. doi:10.1681/ASN.2006080908
  154. Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, et al. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12491-12496. doi:10.1073/pnas.211291398
  155. Wright J, Morales MM, Sousa-Menzes J, et al. Transcriptional adaptation to Clcn5 knockout in proximal tubules of mouse kidney. *Physiol Genomics*. 2008;33(3):341-354. doi:10.1152/physiolgenomics.00024.2008
  156. Norden AGW, Lapsley M, Unwin RJ. Urine retinol-binding protein 4: a functional biomarker of the proximal renal tubule. *Adv Clin Chem*. 2014;63:85-122. doi:10.1016/b978-0-12-800094-6.00003-0
  157. Carraro-Lacroix LR, Lessa LMA, Bezerra CNA, et al. Role of CFTR and CLC-5 in modulating vacuolar H-ATPase activity in kidney proximal tubule. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(4-5):563-576. doi:10.1159/000322324
  158. Fan Y, Bi R, Densmore MJ, et al. Parathyroid hormone 1 receptor is essential to induce FGF23 production and maintain systemic mineral ion homeostasis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2016;30(1):428-440. doi:10.1096/fj.15-278184
  159. Onuchic L, Ferraz-de-Souza B, Mendonca BB, Correa PHS, Martin RM. Potential effects of alendronate on fibroblast growth factor 23 levels and effective control of hypercalciuria in an adult with Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):1098-1103. doi:10.1210/jc.2011-3082
  160. Sato T, Courbebaisse M, Ide N, et al. Parathyroid hormone controls paracellular Ca<sup>2+</sup> transport in the thick ascending limb by regulating the tight-junction protein Claudin14. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(16):E3344-E3353. doi:10.1073/pnas.1616733114

161. Chen Y, Guo X, Deng FM, et al. Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(SUPPL. 2):14012-14017. doi:10.1073/pnas.2436350100
162. Fukuda M. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(18):2801-2813. doi:10.1007/s00018-008-8351-4
163. Tan M, Xia S, Zhang Q, Zhu J, Bao E. The -160C>a polymorphism in E-cadherin is associated with the risk of nephrolithiasis. *PLoS One*. 2013;8(9):1-4. doi:10.1371/journal.pone.0073109
164. Arvaniti E, Moulos P, Vakrakou A, et al. Whole-transcriptome analysis of UUO mouse model of renal fibrosis reveals new molecular players in kidney diseases. *Sci Rep*. 2016;6(December 2015):1-16. doi:10.1038/srep26235
165. Giordano T, Esq JLW, Nathan HM. Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health , Inc . All rights reserved . *Transplantation*. 2018;(July):2018.
166. Al-Bataineh MM, Sutton TA, Hughey RP. Novel roles for mucin 1 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(5):384-391. doi:10.1097/MNH.0000000000000350
167. Liu Z qiang, Lee JN, Son M, et al. Ciliogenesis is reciprocally regulated by PPARA and NR1H4/FXR through controlling autophagy in vitro and in vivo. *Autophagy*. 2018;14(6):1011-1027. doi:10.1080/15548627.2018.1448326
168. Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol*. 2017;27(2):126-140. doi:10.1016/j.tcb.2016.08.002
169. Nandadasa S, Kraft CM, Wang LW, et al. Secreted metalloproteases ADAMTS9 and ADAMTS20 have a non-canonical role in ciliary vesicle growth during ciliogenesis. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-08520-7
170. Dakkak W TA. Characterization of Cellular Protective Effects of ATP13A2/ PARK9 Expression and Alterations Resulting From Pathogenic Mutants. *Physiol Behav*. 2017;176(5):139-148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
171. Davidkova G, Carroll RC. Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci*.

- 2007;27(48):13273-13278. doi:10.1523/JNEUROSCI.3334-07.2007
172. Izquierdo A, Medina-Gómez G. Role of lipotoxicity in the development of kidney damage in metabolic syndrome and aging. *Dial y Traspl.* 2012;33(3):89-96. doi:10.1016/j.dialis.2011.11.001
173. Khan S, Cabral PD, Schilling WP, et al. Kidney proximal tubule lipoapoptosis is regulated by fatty acid transporter-2 (FATP2). *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(1):81-91. doi:10.1681/ASN.2017030314
174. Chiba T, Matsuo H, Kawamura Y, et al. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2015;67(1):281-287. doi:10.1002/art.38884
175. Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, Gan B. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun (London, England).* 2018;38(1):12. doi:10.1186/s40880-018-0288-x
176. Calle P, Torrico S, Muñoz A, Hotter G. CPT1a downregulation protects against cholesterol-induced fibrosis in tubular epithelial cells by downregulating TGF $\beta$ -1 and inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;517(4):715-721. doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.121
177. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre J V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237-244. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x
178. Cuadros T, Trilla E, Sarro E, et al. Molecular and cellular pathobiology HAVCR/KIM-1 activates the IL-6/STAT-3 pathway in clear cell renal cell carcinoma and determines tumor progression and patient outcome. *Cancer Res.* 2014;74(5):1416-1428. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1671
179. Poulter JA, Al-Araimi M, Conte I, et al. Recessive mutations in SLC38a8 cause foveal hypoplasia and optic nerve misrouting without albinism. *Am J Hum Genet.* 2013;93(6):1143-1150. doi:10.1016/j.ajhg.2013.11.002
180. Perez Y, Gradstein L, Flusser H, et al. Isolated foveal hypoplasia with secondary nystagmus and low vision is associated with a homozygous SLC38A8 mutation. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(5):703-706. doi:10.1038/ejhg.2013.212
181. Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, et al. P-Rex1 is required for efficient



- melanoblast migration and melanoma metastasis. 2012.  
doi:10.1038/ncomms1560.P-Rex1
182. Chen KS, Stroup EK, Budhipramono A, et al. Mutations in microRNA processing genes in wilms tumors derepress the IGF2 regulator PLAG1. *Genes Dev.* 2018;32(15-16):996-1007.  
doi:10.1101/gad.313783.118
  183. Puccetti M V, Adams CM, Kushinsky S, Eischen CM. Smarcal1 and Zranb3 protect replication forks from Myc-induced DNA replication stress. *Cancer Res.* January 2019:canres.2705.2018.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2705
  184. Carolina N, J E, Minkoff C, Shenolikar S. Evolution of the Signal Complex Model. *J Biol Chem.* 2000:393-399.
  185. Kurashima K, Szabó EZ, Lukacs G, Orłowski J, Grinstein S. Endosomal recycling of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(33):20828-20836. doi:10.1074/jbc.273.33.20828
  186. Kim JH, Lee-Kwon W, Park JB, Ryu SH, Chris Yun CH, Donowitz M. Ca<sup>2+</sup>-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP- $\alpha$ -actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23714-23724.  
doi:10.1074/jbc.M200835200
  187. Naren AP, Cobb B, Li C, et al. A macromolecular complex of  $\beta$ 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):342-346. doi:10.1073/pnas.0135434100
  188. Zhuang A, Yap FYT, McCarthy D, et al. Globally elevating the AGE clearance receptor, OST48, does not protect against the development of diabetic kidney disease, despite improving insulin secretion. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-50221-0
  189. Zheng J, Maerz W, Gergei I, et al. Mendelian Randomization Analysis Reveals a Causal Influence of Circulating Sclerostin Levels on Bone Mineral Density and Fractures. *J Bone Miner Res.* 2019;34(10):1824-1836. doi:10.1002/jbmr.3803
  190. Tian E, Hoffman MP, Ten Hagen KG. O-glycosylation modulates integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane components. *Nat Commun.* 2012;3:869.  
doi:10.1038/ncomms1874

191. Hebert DN. An MBoC favorite: Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. *Mol Biol Cell*. 2012;23(12):2236. doi:10.1091/mbc.E12-02-0156
192. Zhang T, Wong SH, Tang BL, Xu Y, Hong W. Morphological and functional association of Sec22b/ERS-24 with the pre- Golgi intermediate compartment. *Mol Biol Cell*. 1999;10(2):435-453. doi:10.1091/mbc.10.2.435
193. Dascher C, Balch WE. Mammalian Sly1 regulates syntaxin 5 function in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem*. 1996;271(27):15866-15869. doi:10.1074/jbc.271.27.15866
194. Fernández-Chacón R, Achiriloaie M, Janz R, Albanesi JP, Südhof TC. SCAMP1 function in endocytosis. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12752-12756. doi:10.1074/jbc.275.17.12752
195. Liao H, Ellena J, Liu L, Szabo G, Cafiso D, Castle D. Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis. *Biochemistry*. 2007;46(38):10909-10920. doi:10.1021/bi701121j
196. Guo Z, Liu L, Cafiso D, Castle D. Perturbation of a very late step of regulated exocytosis by a secretory carrier membrane protein (SCAMP2)-derived peptide. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35357-35363. doi:10.1074/jbc.M202259200
197. Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, et al. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and  $\gamma$ -secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26687-26694. doi:10.1074/jbc.M304009200
198. Yang D-S, Tandon A, Chen F, et al. Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28135-28142. doi:10.1074/jbc.M110871200
199. Zhu L, Su M, Lucast L, et al. Dynamin 1 regulates amyloid generation through modulation of BACE-1. *PLoS One*. 2012;7(9):e45033. doi:10.1371/journal.pone.0045033
200. Kanatsu K, Hori Y, Takatori S, Watanabe T, Iwatsubo T, Tomita T. Partial loss of CALM function reduces Abeta42 production and amyloid deposition in vivo. *Hum Mol Genet*. 2016;25(18):3988-3997. doi:10.1093/hmg/ddw239

201. Sharma D, Otto G, Warren EC, Beesley P, King JS, Williams RSB. Gamma secretase orthologs are required for lysosomal activity and autophagic degradation in *Dictyostelium discoideum*, independent of PSEN (presenilin) proteolytic function. *Autophagy*. 2019;15(8):1407-1418. doi:10.1080/15548627.2019.1586245
202. Abrass CK, Berfield AK, Ryan MC, Carter WG, Hansen KM. Abnormal development of glomerular endothelial and mesangial cells in mice with targeted disruption of the lama3 gene. *Kidney Int*. 2006;70(6):1062-1071. doi:10.1038/sj.ki.5001706
203. Barry DM, McMillan EA, Kunar B, et al. Molecular determinants of nephron vascular specialization in the kidney. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-12872-5
204. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112-123. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016
205. O'Connor PM. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(10):961-967. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04475.x
206. Hall AM, Unwin RJ. The not so "mighty chondrion": Emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron - Physiol*. 2006;105(1):1-10. doi:10.1159/000096860
207. Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, et al. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2008;455(4):677-686. doi:10.1007/s00424-007-0316-1
208. Lindén M, Karlsson G. Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218(3):833-836. doi:10.1006/bbrc.1996.0148
209. Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinner FP, Hilschmann N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(9):1059-1070. doi:10.1016/s1357-2725(02)00026-2
210. Meng Y, Sohar I, Wang L, Sleat DE, Lobel P. Systemic administration of tripeptidyl peptidase I in a mouse model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: effect of glycan modification. *PLoS One*. 2012;7(7):e40509-e40509. doi:10.1371/journal.pone.0040509

211. Järvelä I, Sainio M, Rantamäki T, et al. Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease. *Hum Mol Genet.* 1998;7(1):85-90. doi:10.1093/hmg/7.1.85
212. Järvelä I, Lehtovirta M, Tikkanen R, Kyttälä A, Jalanko A. Defective intracellular transport of CLN3 is the molecular basis of Batten disease (JNCL). *Hum Mol Genet.* 1999;8(6):1091-1098. doi:10.1093/hmg/8.6.1091
213. Stumpf M, Müller R, Gaßen B, et al. A tripeptidyl peptidase 1 is a binding partner of the Golgi pH regulator (GPHR) in *Dictyostelium*. *Dis Model Mech.* 2017;10(7):897-907. doi:10.1242/dmm.029280
214. Wagner MC, Molitoris BA. ATP depletion alters myosin I beta cellular location in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 1):C1680-C1690. doi:10.1152/ajpcell.1997.272.5.C1680
215. Boyd-White J, Srirangam A, Goheen MP, Wagner MC. Ischemia disrupts myosin I beta in renal tubules. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(4):C1326-C1335. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1326
216. Poupon V, Stewart A, Gray SR, Piper RC, Luzio JP. The role of mVps18p in clustering, fusion, and intracellular localization of late endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 2003;14(10):4015-4027. doi:10.1091/mbc.e03-01-0040
217. Walmsley SJ, Broeckling C, Hess A, Prenni J, Curthoys NP. Proteomic analysis of brush-border membrane vesicles isolated from purified proximal convoluted tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(6):F1323-31. doi:10.1152/ajprenal.00711.2009
218. Brandstaetter H, Kendrick-Jones J, Buss F. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and *Salmonella* invasion. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 8):1991-2003. doi:10.1242/jcs.097212
219. Tokuo H, Coluccio LM. Myosin-1c regulates the dynamic stability of E-cadherin-based cell-cell contacts in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2013;24(18):2820-2833. doi:10.1091/mbc.E12-12-0884
220. Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999;18(1):55-64. doi:10.1016/s0945-053x(98)00006-7
221. Wagener R, Ehlen HWA, Ko Y-P, et al. The matrilins--adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett.* 2005;579(15):3323-3329. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.018

222. Jonas A, Thiem S, Kuhlmann T, et al. Axonally derived matrilin-2 induces proinflammatory responses that exacerbate autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest*. 2014;124(11):5042-5056. doi:10.1172/JCI71385
223. Van De Weghe JC, Rusterholz TDS, Latour B, et al. Mutations in ARMC9, which Encodes a Basal Body Protein, Cause Joubert Syndrome in Humans and Ciliopathy Phenotypes in Zebrafish. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):23-36. doi:10.1016/j.ajhg.2017.05.010
224. Mehta ZB, Pietka G, Lowe M. The cellular and physiological functions of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. 2014;15(5):471-487. doi:10.1111/tra.12160
225. Armas P, Nasif S, Calcaterra NB. Cellular nucleic acid binding protein binds G-rich single-stranded nucleic acids and may function as a nucleic acid chaperone. *J Cell Biochem*. 2008;103(3):1013-1036. doi:10.1002/jcb.21474
226. Calcaterra NB, Armas P, Weiner AMJ, Borgognone M. CNBP: a multifunctional nucleic acid chaperone involved in cell death and proliferation control. *IUBMB Life*. 2010;62(10):707-714. doi:10.1002/iub.379
227. Lee JM, Choi SS, Lee YH, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM25 regulates adipocyte differentiation via proteasome-mediated degradation of PPAR $\gamma$ . *Exp Mol Med*. 2018;50(10). doi:10.1038/s12276-018-0162-6
228. Marko L, Park J-K, Henke N, et al. B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10) and angiotensin II-induced kidney injury. *Cardiovasc Res*. June 2019. doi:10.1093/cvr/cvz169
229. Ren J, Crowley SD. A complex role for Bcl10 in kidney injury. *Cardiovasc Res*. 2019. doi:10.1093/cvr/cvz320
230. Zhang Y-Y, Fu Z-Y, Wei J, et al. A LIMA1 variant promotes low plasma LDL cholesterol and decreases intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2018;360(6393):1087-1092. doi:10.1126/science.aao6575
231. Fu W, Jiang Q, Zhang C. Novel functions of endocytic player clathrin in mitosis. *Cell Res*. 2011;21(12):1655-1661. doi:10.1038/cr.2011.106
232. Ballarino M, Jobert L, Dembélé D, de la Grange P, Auboeuf D, Tora L. TAF15 is important for cellular proliferation and regulates the expression of a subset of cell cycle genes through miRNAs. *Oncogene*. 2013;32(39):4646-4655. doi:10.1038/onc.2012.490

233. Orr SE, Bridges CC. Chronic kidney disease and exposure to nephrotoxic metals. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5). doi:10.3390/ijms18051039
234. Peters BA, Hall MN, Liu X, et al. Renal function is associated with indicators of arsenic methylation capacity in Bangladeshi adults. *Environ Res.* 2015;143(Pt A):123-130. doi:10.1016/j.envres.2015.10.001
235. Jung H, Lee S, Zhang J, Yang J, Ji H, Wu JY. TMEM9 Promotes Intestinal Tumorigenesis via v-ATPase-Activated Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. 2019;20(12):1421-1433. doi:10.1038/s41556-018-0219-8.TMEM9
236. Dodeller F, Gottar M, Huesken D, Iourgenko V, Cenni B. The lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(31):21487-21494. doi:10.1074/jbc.M801908200

