



Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

**GLUTAMINASA GLS2 EN CEREBRO Y CÁNCER:  
NUEVAS LOCALIZACIONES CELULARES E  
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTIVAS  
MEDIANTE APROXIMACIONES NEUROQUÍMICAS Y  
PROTEÓMICAS**

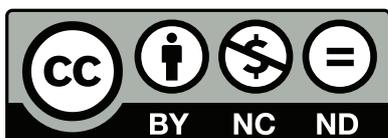
Carolina Cardona Ramírez  
Málaga, 2014



**Publicaciones y  
Divulgación Científica**

AUTOR: Carolina Cardona Ramírez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular y Bioquímica**

ANA MARÍA RODRÍGUEZ QUESADA, Directora del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE: la Tesis Doctoral titulada: “GLUTAMINASA GLS2 EN CEREBRO Y CÁNCER: NUEVAS LOCALIZACIONES CELULARES E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTIVAS MEDIANTE APROXIMACIONES NEUROQUÍMICAS Y PROTEÓMICAS”, que presenta Dña. CAROLINA CARDONA RAMÍREZ para optar al título de Doctora en Ciencias (Biológicas), ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Javier Márquez Gómez, Catedrático de Universidad, y D. Francisco J. Alonso Carrión, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Málaga a

18 de Marzo de 2014.

Fdo. Ana María Rodríguez Quesada





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

FRANCISCO JOSÉ ALONSO CARRIÓN, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

ACREDITAN QUE:

Dña. CAROLINA CARDONA RAMÍREZ, Licenciada en Biología y Química en la Universidad de Caldas (Colombia), ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos recogidos en la presente Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste, firman la presente en Málaga a 18 de Marzo de 2014.

Fdo. Javier Márquez Gómez  
Catedrático Bioquímica y  
Biol. Molecular

Fdo. Francisco José Alonso Carrión  
Catedrático Bioquímica y  
Biol. Molecular



Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto SAF2010-17573 del Ministerio de Ciencia e Innovación, el proyecto de excelencia CVI-6656 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, y la red RETICS de Trastornos Adictivos (RTA) RD12/0028/0013. La consejería de Educación de la Junta de Andalucía concedió una beca a la doctoranda con cargo al proyecto PI-0825/2010, quién también disfrutó de una beca con cargo al grupo de investigación de la Junta de Andalucía BIO-179. Parte de los resultados recogidos en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- Martín-Rufián M1, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Cheng T, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Szeliga M, Albrecht J, Curi R, Márquez J, Colquhoun A, Deberardinis RJ, Matés JM. Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med.* (2014) 92:277-90.
- Márquez J, Cardona C, Campos-Sandoval JA, Peñalver A, Tosina M, Matés JM, Martín-Rufián M. Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metab Brain Dis.* (2013) 28:133-7.
- de la Rosa V1, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem Int.* (2009) 55:76-84.

#### ***Comunicaciones a congresos:***

R. Nascimento-Gomes M. Martín-Rufián A. Higuero AR Crisma, MC. Gómez-García, C Cardona, T Cheng, JA. Campos-Sandoval C. Lobo, JA. Segura, FJ. Alonso, R Curi, J Márquez, RJ DeBerardinis, JM Matés, A. Colquhoun. GLUTAMINASE ISOENZYMES AND ROS LEVELS REGULATING APOPTOSIS AND CANCER PROLIFERATION IN GLIOMA TUMOR CELLS. "Drug Discovery & Therapy World Congress 2013". Boston, USA (June 3-6, 2013).

C. Cardona, L. Castilla, L. Jiménez-Santaella, M. Martín-Rufián, C. Lobo, F. J. Alonso, J. Marquez. FUNCTION OF BRAIN PDZ PROTEIN GIP ASSESSED BY PROTEOMIC APPROACHES. Comunicación oral, EUPA-2012, Glasgow.

C. Cardona, E. Blanco, Campos-Sandova, J. Suárez, A. Gutiérrez, L. Castilla, M. Martín-Rufián, F. J. Alonso, F. Rodriguez de Fonseca, J. Márquez. Facultad de Ciencias. Fundación IMABIS. ADICCIÓN A COCAÍNA Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS GLUTAMINASA. Comunicación oral, Reunión Científica Red de trastornos Adictivos-CIBERSAM, Salamanca 2011.

C. Cardona, Laura Castilla, Juan A. Segura, José M. Matés, Francisco J. Alonso, A. Gutiérrez and J. Márquez. BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA GIP (“GLUTAMINASE-INTERACTING PROTEIN”) MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS, Poster, XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba 2010.

Luis Vicioso, Martina Álvarez, Carolina Cardona, José Manuel Matés, Juan Antonio Segura, Javier Márquez y Francisco José Alonso. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN TISULAR DE LAS ISOENZIMAS DE GLUTAMINASA CON LA AGRESIVIDAD DE TUMORES HUMANOS DE ALTA INCIDENCIA, Poster, XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba 2010.

Cardona C, López-Téllez JF, Jiménez AJ, Khan ZU2, Tosina M, Alonso FJ, Gutiérrez A, Márquez J. NEW INSIGHTS INTO BRAIN GLUTAMINASES: BEYOND THEIR ROLE ON GLUTAMATERGIC TRANSMISSION. Comunicación oral, Reunión Científica Red de trastornos Adictivos-CIBERSAM, Tarragona 2009.

M. Tosina, C. Cardona, J.A. Campos-Sandova, Juan A. Segura, José M. Matés, Francisco J. Alonso, A. Gutiérrez and J. Márquez. Human PDZ protein GIP: interaction with glutaminase and expression in mammalian brain, poster, XVIII European Symposium of the Protein Society, Zurich (Suiza), Junio 2009.

## **Gracias...**

*Son numerosas las personas a las que debo agradecer por ayudarme en esta etapa tan importante de mi vida y no quiero empezar sin antes dejar plasmado en este blanco papel, el agradecimiento infinito a mis padres, Herman Cardona Gallego y Edelmira Ramírez Murcia. A mis dos familias, Cardona y Ramírez, mil y mil gracias por el apoyo incondicional.*

*Debo agradecer de manera especial y sincera a mis jefes Javier Márquez y Francisco José Alonso Carrión, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. El apoyo, la confianza en mi trabajo y la disposición de ambos a la hora de orientarme en este camino, es sin duda alguna, un aporte invaluable que permanecerá por siempre en el cajón de los recuerdos de las más gratas y fructíferas experiencias que he vivido. Agradecer también las constantes palabras de aliento en situaciones difíciles y por transmitirme ese gusto por el quehacer científico en todo momento.*

*Gracias JACS por estar siempre presente cuando más lo he necesitado, por ser mi maestro en los últimos años, por brindarme tu amistad y apoyo constante.*

*Quiero también, agradecer a los Doctores José Manuel Matés y Juan Antonio Segura Checa por su apoyo y por su calidez, razón esta, que ha permitido que mi estancia en la facultad sea placentera y familiar.*

*A mis compañeros y amigos de lucha en el laboratorio, con los que he compartido anécdotas, crudos y dulces momentos. A ellos, siempre incondicionales, atentos y dispuestos...Vanessa de la Rosa, Carolina Lobo, Marta Tosina, Laura Castilla, Mercedes Martín, Ana Higüero, Laura Rueda, Paloma, Wanito, David, Jorge, Ana Peñalver, Mamen Gómez García, Héctor Valverde, José Esteban, Vanessa Castro, Alejandra Valderrama, José Molina.... Gracias por hacer parte de este proceso.*

*A la Doctora Antonia Gutiérrez mis más sinceros agradecimientos por la ayuda prestada para el desarrollo de gran parte de este trabajo. Por su disposición continua y por ofrecerme siempre palabras que motivaron el latente deseo de sacar esta tesis adelante.*

*A todos los integrantes del laboratorio Bilogía Celular, quiero agradecerles su ayuda constante y admirable disposición para ayudar en cada momento.*

*Gracias de corazón.*



## 1. Introducción

<b>1.1 Síntesis del neurotransmisor glutamato y características generales de su metabolismo .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Genes y transcritos de GA en mamíferos.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Al menos tres isoenzimas GA se expresan en el cerebro de mamíferos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Proteínas que interaccionan con GA en cerebro .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Expresión de GIP en cerebro de mamíferos .....</b>	<b>22</b>

## 2. Objetivos

<b>Objetivos.....</b>	<b>26</b>
-----------------------	-----------

## 3 Metodología Experimental

<b>3.1 Materiales .....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Productos empleados .....	28
3.1.2 Equipamiento.....	28
3.1.3 Material fungible .....	31
<b>3.2 Esterilización de soluciones y materiales.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Material biológico empleado.....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas .....	32
3.3.2 Vectores de expresión y construcciones utilizadas en este trabajo .	33
pET-3c-GAB .....	33
pGEX-GIP.....	34
pQE-31GIP <sub>1-124</sub> .....	34
pQE-KGA <sub>551-669</sub> .....	35
3.3.3 Animales de experimentación .....	35
3.3.4 Líneas celulares de mamíferos.....	35
<b>3.4 Métodos .....</b>	<b>36</b>
3.4.1 Cultivo y almacenamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.4.2 Preparación de células competentes .....	37
3.4.3 Transformación de células competentes .....	37
3.4.4 Cultivos de bacterias transformadas .....	38
3.4.5 Expresión heteróloga de proteínas en <i>E. coli</i> .....	38
3.4.6 Aislamiento de DNA plasmídico .....	39
3.4.7 Digestión del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción ....	40
3.4.8 Cultivo y criopreservación de líneas celulares tumorales .....	40
3.4.9 Purificación de proteínas recombinantes.....	40
3.4.9.1 Purificación de GAB.....	40

<b>3.4.9.2 Purificación de proteínas fusionadas a etiqueta de 6</b>	
<b>Histidinas</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4.10 Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad</b> .....	<b>43</b>
3.4.10.1 Preparación de la columna.....	43
3.4.10.2 Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	44
<b>3.4.11 Obtención de extractos solubles de proteínas nucleares de cerebro</b>	
<b>de rata</b> .....	<b>46</b>
3.4.11.1 Aislamiento de núcleos a partir de cerebro de rata .....	46
3.4.11.2 Preparación de extractos nucleares solubles .....	46
3.4.11.3 Determinación cuantitativa de proteínas .....	47
3.4.11.4 Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.....	47
3.4.11.5 Inmunotransferencia Western .....	48
<b>3.4.12 Aislamiento de proteínas asociadas a GIP en fracciones nucleares</b>	
<b>de cerebro de rata mediante cromatografía de afinidad</b> .....	<b>49</b>
3.4.12.1 Preparación de una columna de afinidad GIP-Sefarosa .....	49
3.4.12.2 Preparación de una columna de afinidad BSA-Sefarosa	
utilizada como columna control .....	49
3.4.12.3 Clarificación del extracto nuclear soluble de cerebro de rata	
.....	49
3.4.12.4 Purificación por afinidad del extracto nuclear soluble de	
cerebro de rata .....	50
<b>3.4.13 Tinción de geles con Ag compatible con EM</b> .....	<b>50</b>
<b>3.4.14 Espectrometría de Masas</b> .....	<b>51</b>
3.4.14.1 Lavado y desteñido de las bandas.....	51
3.4.14.2 Digestión con tripsina.....	52
3.4.14.3 Extracción de los péptidos tripticos.....	52
3.4.14.4 Identificación de proteínas por espectrometría de masas..	52
3.4.14.5 String 9.0: búsqueda de relación proteína- proteína .....	53
<b>3.4.15 Experimentos de inmunoprecipitación</b> .....	<b>53</b>
<b>3.4.15.1 Inmuncaptura de proteínas en ProteinChip arrays PS20.</b>	<b>54</b>
<b>3.4.15.2 Análisis del complejo de proteínas capturadas en el Array</b>	
<b>PS20</b> .....	<b>56</b>
<b>3.4.16 Actividad GA in vivo</b> .....	<b>56</b>
3.4.16.1 Extracción del tejido .....	56
3.4.16.2 Congelación en nitrógeno líquido .....	56
3.4.16.3 Obtención de secciones en criostato para actividad	
enzimática GA.....	56
3.4.16.4 Preparación del medio de incubación para la detección de	
actividad GA .....	57
3.4.16.5 Ensayo de actividad enzimática GA en cerebro de rata.....	58

3.4.16.6 Post-fijación del tejido.....	58
3.4.16.7 Montaje de las preparaciones.....	58
3.4.16.8 Controles de la reacción histoquímica de actividad GA.....	58
3.4.16.9 Inmunofluorescencia posterior al tratamiento histoquímico para la detección de actividad GA.....	59
<b>3.4.17 Inmunocitoquímica en líneas tumorales humanas .....</b>	<b>59</b>
3.4.17.1 Medios de cultivo para células eucariotas .....	59
3.4.17.2 Tratamiento de células SHSY-5Y con ésteres de forbol PMA .....	60
<b>3.4.18 Inmunohistoquímica .....</b>	<b>62</b>
3.4.18.1 Fijación de los cerebros .....	62
3.4.18.2 Crioprotección y congelación .....	62
3.4.18.3 Obtención de las secciones.....	62
<b>3.4.19 Inmunotinción.....</b>	<b>63</b>
3.4.19.1 Inmunohistoquímica para microscopía óptica.....	63
3.4.19.2 Técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina .....	64
<b>3.4.20 Inmunofluorescencia en cerebro de rata .....</b>	<b>65</b>
3.4.20.1 Inmunofluorescencia en tejido humano.....	65
3.4.20.2 Controles de la técnica inmunocitoquímica .....	66
<b>3.4.21 Microscopia Electrónica de Transmisión .....</b>	<b>67</b>
3.4.21.1 Fijación del tejido y obtención de secciones.....	67
3.4.21.2 Inmunohistoquímica en pre-inclusión .....	68
3.4.21.3 Deshidratación e inclusión en plano.....	69
3.4.21.4 Montaje y tallado en bloques de resina .....	70
3.4.21.5 Ultramicrotomía .....	70
3.4.21.6 Contrastado de las rejillas.....	71
3.4.21.7 Observación y procesamiento de imágenes.....	71
<b>3.4.22 RT-PCR A TIEMPO REAL.....</b>	<b>72</b>
3.4.22.1 Aislamiento de astrocitos de cerebelo de rata.....	72
3.4.22.2 Extracción de RNA total .....	72
3.4.22.3 Transcripción reversa del RNA total de astrocitos de rata..	73
3.4.22.4 RT-PCR cuantitativa.....	74

## 4 Resultados

<b>4.1 Localización regional y subcelular de las isoformas GAB y KGA en cerebro de rata .....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Validación de anticuerpos purificados (anti-KGA y anti-GAB).....	79
4.1.2. Caracterización inmunohistoquímica (IHC) de isoenzimas GA en cerebro de rata .....	80

4.1.2.1. <i>Expresión regional de KGA y GAB en cerebro de rata</i> .....	80
<b>4.2 <i>Expresión de GA en células gliales</i></b> .....	<b>88</b>
4.2.1 <i>Actividad GA en astrocitos de cerebelo de rata</i> .....	88
4.2.2 <i>Identificación de actividad GA en astrocitos</i> .....	94
4.2.3 <i>Cuantificación absoluta del mRNA de isoenzimas GA en astrocitos</i> .....	96
4.2.4 <i>Detección de isoformas GA en astrocitos de cerebelo de rata</i> ..	97
4.2.5 <i>Localización de GAB y KGA en astrocitos de rata</i> .....	98
4.2.5.1 <i>Localización de KGA en astrocitos de cerebro rata</i> ....	100
4.2.5.2 <i>Localización de KGA en astrocitos de cerebro humano</i> .....	102
<b>4.3 <i>Expresión de isoenzimas GA en cuerpos celulares y terminales nerviosos perivasculares</i></b> .....	<b>104</b>
<b>4.4 <i>Expresión nuclear de GAB en líneas tumorales humanas</i></b> .....	<b>106</b>
4.4.1 <i>Expresión nuclear de GAB en células de glioblastoma humano T98G y T98G-GAB</i> .....	106
4.4.2 <i>Localización nuclear de GAB en células de neuroblastoma SHSY-5Y</i> .....	108
<b>4.5 <i>Efecto de los ésteres de forbol (PMA) en la expresión nuclear de GAB en células SHSY-5Y y hepG2</i></b> .....	<b>111</b>
<b>4.6 <i>Localización subnuclear de GAB en células de cáncer humano</i></b> .....	<b>113</b>
4.6.1. <i>Isoenzima GAB y nuclear speckles</i> .....	113
4.6.2. <i>Localización subnuclear de GAB en nucleolo</i> .....	115
4.6.3 <i>Localización subnuclear de GAB en nucleoplasma</i> .....	117
<b>4.7 <i>Búsqueda, identificación y validación de proteínas nucleares que interaccionan con GIP mediante métodos proteómicos</i></b> .....	<b>119</b>
4.7.1 <i>Validación de anticuerpos purificados (anti-GIP)</i> .....	119
4.7.2 <i>Localización de la proteína GIP en cerebro de rata</i> .....	120
4.7.3 <i>Localización perivascular de GIP en cerebro de rata</i> .....	122
<b>4.8 <i>Aislamiento y caracterización de proteínas nucleares que interactúan con GIP</i></b> .....	<b>123</b>
4.8.1 <i>Aislamiento de proteínas nucleares que interaccionan con GIP mediante cromatografía de afinidad</i> .....	124
4.8.2 <i>Identificación de proteínas que interactúan con GIP mediante espectrometría de masas</i> .....	127
4.8.3 <i>String 9.0: búsqueda de interacciones proteína- proteína</i> .....	132
<b>4.9 <i>Validación de proteínas que interaccionan con GIP por SELDI-TOF-MS</i></b> .....	<b>134</b>
<b>4.10 <i>Validación del interacto Bassoon por inmunoprecipitación con anticuerpos e inmunotransferencia Western</i></b> .....	<b>142</b>

## **5 Discusión**

<b>5.1 Expresión de GA en cerebro de mamíferos. ....</b>	<b>144</b>
5.1.1 Expresión de GA en neuronas.....	144
5.1.2 Expresión de GA en astrocitos.....	149
5.1.3 Expresión perivascular de GA.....	157
<b>5.2 Expresión de GA en líneas celulares de cáncer humano.....</b>	<b>159</b>
5.2.1 Localización subnuclear de GAB en células tumorales.....	164
<b>5.3 Expresión de la proteína GIP en cerebro de rata .....</b>	<b>165</b>
<b>5.4 Aislamiento y caracterización de proteínas nucleares que interaccionan con GIP .....</b>	<b>167</b>
GRUPO I: NEUROFILAMENTOS, MEMBRANA/ENVOLTURA NUCLEAR: .....	170
GRUPO II: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL:.....	171
GRUPO III: CASCADAS/RUTAS DE SEÑALIZACIÓN:.....	175
GRUPO IV: FORMACIÓN Y TRÁFICO DE VESÍCULAS DE TRANSPORTE: .....	176

## **6. Conclusiones**

<b>Conclusiones.....</b>	<b>184</b>
--------------------------	------------

## **7. Apéndice**

<b>Apéndice.....</b>	<b>188</b>
----------------------	------------

## **6. Bibliografía**

<b>Bibliografía.....</b>	<b>198</b>
--------------------------	------------



## *Introducción*

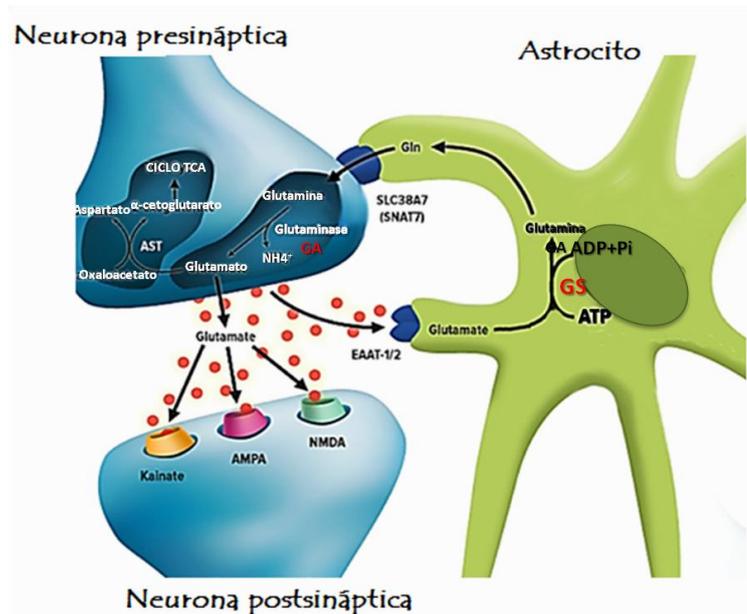
### **1.1 Síntesis del neurotransmisor glutamato y características generales de su metabolismo**

Los astrocitos son un tipo de célula glial del sistema nervioso central (SNC), considerados clásicamente como células de soporte protector, estructural y metabólico de las neuronas. Es bien conocido que estas células tienen también una participación muy activa en el procesamiento de la información durante la actividad sináptica. Asimismo, transfieren metabolitos y moléculas de señalización a otras células a través de uniones gap (Diniel, 2013), facilitando la comunicación y la asistencia metabólica en circunstancias fisiológicas concretas. Además de ser células de soporte para la transmisión del impulso nervioso neuronal, los astrocitos son células excitables y su excitabilidad está basada en variaciones de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  al igual que las neuronas (Haydon, 2001; Evanko *et al.*, 2004; Fields y Burnstock, 2006). La activación de células astrocitarias conduce a la liberación de gliotransmisores como glutamato (Glu) y ATP, que estimulan directamente a las neuronas (Haydon, 2001; Evanko *et al.*, 2004; Fields y Burnstock, 2006). La transferencia de la información bidireccional entre astrocitos y neuronas es la base del concepto de “sinapsis tripartita” (Perea *et al.*, 2009), funcionalmente constituida por elementos pre y postsinápticos y por los astrocitos adyacentes.

El Glu es el principal neurotransmisor activador del SNC en vertebrados y como tal, su presencia en este tejido está altamente regulada. La homeostasis del Glu se logra por múltiples procesos que tienen lugar en la sinapsis tripartita donde este aminoácido es liberado y utilizado para el metabolismo general (Fonnum, 1984; Erecinska y Silver, 1990). Una especial atención se ha dirigido al estudio de los mecanismos que regulan la liberación del Glu por las neuronas y a su inactivación posterior, lo que ha conducido a la caracterización de sus receptores postsinápticos, probablemente los más estudiados y mejor comprendidos del SNC (Watkins y Jane, 2006). Sin embargo, entender los mecanismos involucrados en la función cerebral del Glu, exige no sólo el

conocimiento detallado de sus receptores postsinápticos, sino también todas las enzimas que están involucradas en su producción, liberación y metabolismo.

Los astrocitos poseen sistemas de recaptación de alta afinidad para algunos neurotransmisores como Glu, alanina o GABA. El Glu que proviene de la actividad sináptica es convertido en glutamina (Gln) (aminoácido que podemos considerar una forma no tóxica de Glu y amonio) mediante la enzima glutamina sintetasa dependiente de ATP (GS; EC 6.3.1.2) (Martínez-Hernández *et al.*, 1977; McKenna, 2007). La Gln así sintetizada es enviada de vuelta a las neuronas, habiéndose postulado de esta forma un ciclo Gln/Glu entre neuronas y astrocitos para explicar el reciclaje de neurotransmisores, que incluye tanto procesos glicolíticos, como de biosíntesis y de degradación oxidativa de Glu en cerebro (Peng *et al.*, 1993; Hertz, 1979; Hertz *et al.*, 2000). La existencia de este ciclo, supone que la Gln sintetizada en el astrocito es liberada a través de transportadores de Gln y que ésta es captada posteriormente por las neuronas (Fig. 1). A continuación, la glutaminasa neuronal (GA; EC 3.5.1.2) cataliza su desamidación hidrolítica, dando lugar a cantidades estequiométricas de Glu y amonio (Nicklas *et al.*, 1987). El modelo explica bien el suministro de un precursor adecuado para la síntesis de Glu en neuronas. En el contexto descrito para el ciclo Gln/Glu, la actividad de la enzima GS es exclusiva de astrocitos, mientras que la actividad GA es neuronal (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Laake *et al.*, 1995). Sin embargo, existen evidencias que sugieren una localización astrogliar de isoenzimas GA en cultivos primarios (Kvamme *et al.*, 2008). Este hecho será ampliamente discutido en esta memoria.



**Figura 1. Ciclo Gln/Glu en cerebro.** El Glu es convertido a Gln mediante la actividad enzimática GS. La Gln es entonces transportada a las neuronas presinápticas vía transportador SLC38A7 (transportador de sodio acoplado a aminoácidos neutros 7, SNAT7). Dentro de la neurona presináptica, el Glu se forma a partir de Gln a través de la actividad enzimática GA, y es almacenado en vesículas de secreción para su posterior liberación después de la activación de un potencial de acción. En la hendidura sináptica, el Glu es captado por los astrocitos mediante transportadores sodio-dependientes EAAT1 y EAAT2 (transportadores de aminoácidos excitadores 1 y 2, también conocidos como transportadores gliales de Glu de alta afinidad). Dentro del astrocito el Glu es convertido de nuevo en Gln. Imagen tomada de la página web: [themedicalbiochemistry.org](http://themedicalbiochemistry.org).

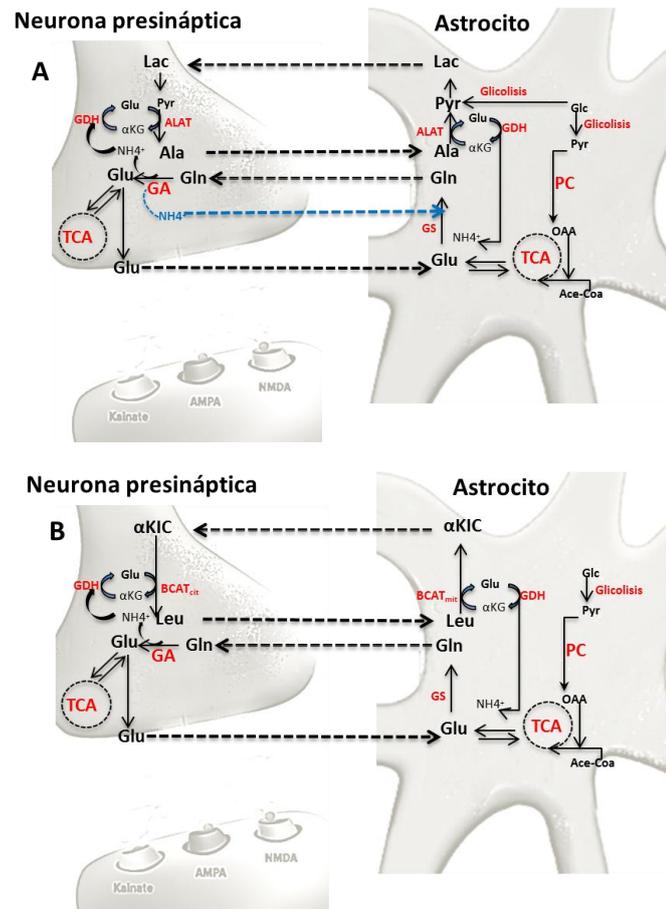
En cerebro, existen al menos cuatro reservorios (“pools”) de Glu: el neurotransmisor, el metabólico, Glu precursor de GABA en neuronas inhibitoras y Glu precursor de Gln en células gliales (Broman *et al.*, 2000). Pese a que ha sido objeto de numerosas investigaciones, aún no se conoce completamente cuál es el origen del Glu que actúa como neurotransmisor cerebral. No obstante, existe un amplio consenso que establece que el Glu neurotransmisor producido en neuronas deriva principalmente de la Gln a través de la enzima GA. Por su parte, el Glu intracelular metabólico (no neurotransmisor) procede de la aminación reductiva vía glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2) y/o transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG) generado a partir de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). La síntesis de Glu a través de esta vía requiere del aporte de un grupo amino. Se ha demostrado que los terminales sinápticos poseen transportadores de aminoácidos de alta afinidad (Shank y Bennett, 1993). Así, los aminoácidos leucina, valina (Yudkoff *et al.*, 1996) y alanina (Erecinska *et al.*, 1994) podrían actuar como donadores de nitrógeno para la síntesis de Glu. Este

Glu podría llegar a representar aproximadamente el 50 % del *pool* total (Palaiologos *et al.*, 1988; Waagepetersen *et al.*, 2005). El mecanismo descrito, supone la pérdida de  $\alpha$ KG, por lo que éste ha de ser repuesto a través de reacciones anapleróticas, como la catalizada por la enzima piruvato carboxilasa (PC; EC 6.4.1.1) en las neuronas (Hassel y Brathe, 2000).

En los astrocitos, el Glu, además de ser usado para la síntesis de Gln vía GS, puede ser oxidado contribuyendo en parte a satisfacer las necesidades energéticas de estas células (Diniel, 2013). Asimismo, el Glu podría ser sintetizado a partir de  $\alpha$ KG. Se ha comprobado que entre un 10-30% del Glu suministrado a la neurona en forma de Gln por el astrocito procede de anaplerosis glial (Lebon *et al.*, 2002; Maciejewski *et al.*, 2008). En esta memoria se discutirán otras posibles fuentes anapleróticas de Glu astroglial.

El mantenimiento de la neurotransmisión requiere de la energía liberada en la glicolisis y el ciclo TCA en neuronas y células gliales a partir de glucosa (Glc), principal sustrato energético del cerebro. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $[^{13}\text{C}]$  RMN) constituye una sofisticada técnica para el estudio del metabolismo celular, que en el caso del SNC permite analizar las interacciones metabólicas entre neuronas y células gliales (Gadian *et al.*, 1993; Kunnecke *et al.*, 1995). Estos estudios *in vivo* sugieren que el ciclo Gln/Glu es la principal vía metabólica y que su tasa se incrementa de forma proporcional a la tasa de oxidación de Glc en neuronas (Patel *et al.*, 2004; Sibson *et al.*, 1998). Como se ha indicado, el astrocito convierte Glu exógeno en Gln endógena (Waniewiski y Martin, 1986) y para tal efecto se necesita un transporte efectivo de amonio desde las neuronas hasta los astrocitos (Waagepetersen *et al.*, 2000; Marcaggi y Coles, 2001). Los astrocitos puedan captar directamente el amonio por difusión (Fig. 2A) sin evidencias de que este consumo sea acoplado a la función sináptica (Nagaraja y Brookes, 1998). El amonio generado por la actividad GA en neuronas podría ser también transportado al astrocito después de su incorporación a aminoácidos como la alanina (Fig. 2A) o aminoácidos de cadena ramificada (Fig. 2B). La síntesis de estos aminoácidos depende de la aminación reductiva de  $\alpha$ KG a Glu vía GDH en neuronas y su posterior

transaminación con piruvato (alanina aminotransferasa, ALAT) o  $\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos de cadena ramificada (aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada, BCAT) (Fig. 2). La alanina y aminoácidos de cadena ramificada podrían ser transportados al exterior de la neurona mediante transportadores de aminoácidos neutros o específicos, acoplados a sodio, y posteriormente ser captados por los astrocitos (Douglas *et al.*, 2012). En el astrocito, el amonio se liberaría mediante reacciones producidas en el orden inverso al anteriormente comentado.



**Figura (2). Transferencia de amonio entre neuronas y astrocitos. A) Transportador Alanina-lactato entre neuronas y astrocitos.** El amonio producido en neuronas es incorporado a  $\alpha$ KG para la producción de Glu mediante la actividad GDH; a continuación, la alanina, procede de la transaminación catalizada por alanina aminotransferasa (ALAT), con el piruvato. La alanina es transportada al astrocito en donde es sometida a reacciones inversas para la producción de Glu. Finalmente el amonio liberado mediante la actividad GDH es utilizado para la síntesis de Gln (Waagepetersen *et al.*, 2000). En azul se representa la difusión del amonio en su forma gaseosa hasta el astrocito (como un mecanismo alternativo para el transporte del amonio), donde es equilibrado en su forma protonada y usado posteriormente para la síntesis de Gln. **B. Transferencia de amonio mediada por aminoácidos de cadena ramificada.** Como ejemplo se muestra el transporte de leucina. El amonio incorporado en Glu mediante aminación reductiva vía GDH es posteriormente transaminado hasta  $\alpha$ -cetoisocaproato para formar leucina. En los astrocitos, la leucina es transaminada para formar el  $\alpha$ -cetoácido correspondiente y Glu mediante la actividad de una aminotransferasa mitocondrial. Finalmente, el amonio es liberado del Glu por la reacción catalizada por la GDH (Liethe *et al.*, 2001). TCA, ciclo de ácidos tricarbónicos; GDH, glutamato deshidrogenasa; Leu, leucina; Ace-Coa, Acetil-Coa; Ala, alanina; ALAT, alanina aminotransferasa;  $\alpha$ KIC,  $\alpha$ -cetoisocaproato; BCAT, aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada; Lac, lactato; OAA, oxaloacetato; PC, piruvato carboxilasa; Pyr, piruvato.

Otra importante función del astrocito aparte de la regulación de la neurotransmisión mediada por Glu, su implicación en el metabolismo energético y su papel como neuroprotector, es el mantenimiento de la homeostasis del potasio ( $K^+$ ) y la amortiguación de la acidosis metabólica extracelular (Haussinger *et al.*, 2000).

La síntesis de Gln a partir de Glu no es la única vía por la que el cerebro puede eliminar amonio, ion que a altas concentraciones resulta tóxico (Hertz *et al.*, 2004). Los astrocitos son muy permeables al ion  $K^+$  debido a la presencia de multitud de canales iónicos de  $K^+$  en su membrana, muy especialmente localizados en los pies perivasculares (Newman *et al.*, 1986). El amonio es un ion cargado positivamente que tiene propiedades similares al ion  $K^+$ . El amonio puede cruzar así las membranas celulares del astrocito, a través de canales iónicos o transportadores de membrana, pudiendo reemplazar a iones como el  $K^+$  u otros como el hidrógeno. En cultivos celulares se ha demostrado esta interferencia del amonio con el transporte del  $K^+$ , lo que favorece su acumulación extracelular. Este hecho frecuentemente se observa en pacientes que desarrollan encefalopatía hepática (HE) (Lichter-Konecki, 2008), donde la hiperamonemia es un factor clave en el desarrollo de esta patología (Shawcross *et al.*, 2005; Haussinger *et al.*, 2008). Cuando altas concentraciones de amonio llegan al SNC, el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, hace que tanto los astrocitos como las neuronas lo capten convirtiéndolo en Gln, que eleva así su concentración en el citoplasma. La Gln puede comportarse como una molécula osmóticamente activa, lo que induciría la entrada de agua (*swelling*), provocando lesiones celulares (Shawcross *et al.*, 2005; Blei *et al.*, 1994; Rama *et al.*, 2007). Estudios adicionales han demostrado que el incremento en las concentraciones de amonio, y el consecuente aumento en la síntesis de Gln, produce una disfunción mitocondrial conocida como MPT (transición de la permeabilidad mitocondrial), que da como resultado la pérdida de la permeabilidad selectiva a pequeños solutos y que puede jugar un papel clave en el mencionado *swelling* del astrocito (Cordoba *et al.*, 1999; Yajakumar *et al.*, 2006).

En esta misma línea y como una alternativa para explicar la neurotoxicidad del amonio en HE, Albrecht y Noremberg (2006), plantearon la hipótesis del caballo de Troya, hipótesis que también postula a la Gln como causa fundamental en la patogénesis de la enfermedad: la Gln sintetizada en astrocitos sería transportada desde el citoplasma hasta el interior de la mitocondria, vía un

transportador de Gln sensible a histidina (Albrecht *et al.*, 2000). Este proceso podría ser potenciado por el amonio que estimula el consumo de Gln (Dolinska *et al.*, 1996), ya que se ha demostrado que la presencia de amonio “per se” no induce MPT y requiere de la síntesis de Gln para generar el daño (Albrecht *et al.*, 2006). La Gln sería entonces metabolizada por GA, que produciría Glu y amonio. La concentración de amonio en el compartimento mitocondrial podría alcanzar niveles extremadamente altos, induciendo MPT y la producción de radicales libres con el consiguiente daño oxidativo de los constituyentes mitocondriales y el *swelling* celular. De esta forma, tras su transporte y catabolismo mitocondrial, la Gln se comportaría como un caballo de Troya sirviendo como transportador de amonio en la mitocondria y causando neurotoxicidad a través de su desamidación por la actividad GA (Albrecht y Norenberg., 2006). La hipótesis del caballo de Troya de Norenberg y Albrecht requiere, necesariamente, la presencia de actividad GA mitocondrial en astrocitos. No obstante, hasta la fecha, no se ha detectado la presencia de GA en astrocitos *in vivo*. Este es un hecho muy controvertido que requiere evidencias experimentales sólidas para ser confirmado.

### **1.2 Genes y transcritos de GA en mamíferos**

En mamíferos se han descrito dos genes que codifican para diferentes isoenzimas GA. En humanos estos dos genes se localizan en dos cromosomas distintos. El gen *GLS* se localiza en el cromosoma 2, tiene una longitud de 82 kb y está constituido por 19 exones (Porter *et al.*, 2002). Al menos dos transcritos diferentes se originan a partir de este gen: el mRNA denominado KGA, formado al unirse los exones 1 a 14 con los exones 16 a 19, y un segundo transcrito que aparece por corte y empalme alternativo, denominado GAC, y que utiliza tan sólo los 15 primeros exones del gen, omitiendo los exones 16-19, tal y como se puede observar en la Figura 3 (Elgadi *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2002).

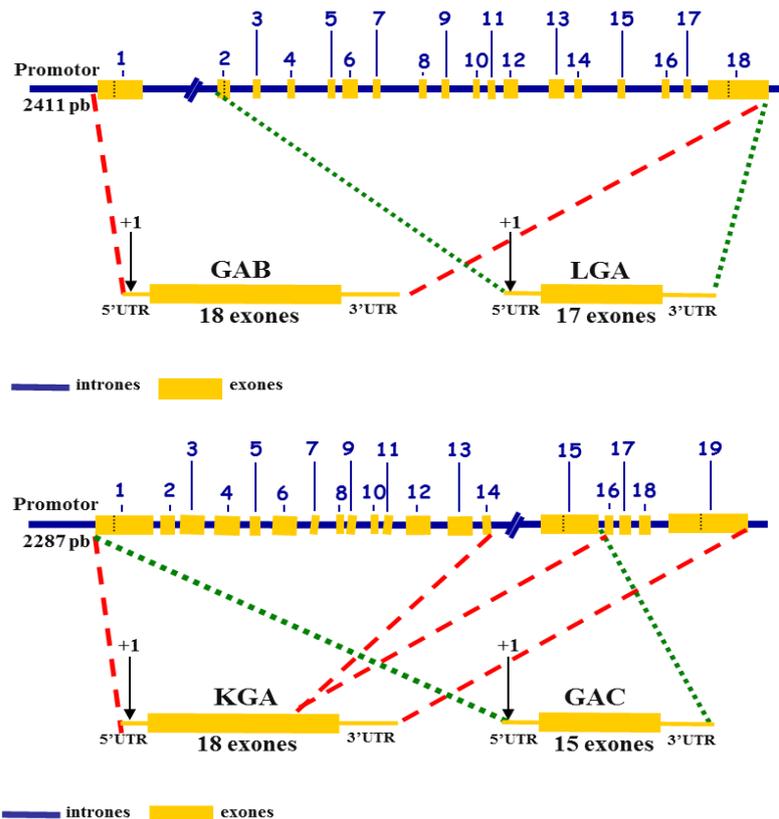
El segundo gen, *GLS2*, se localiza en el cromosoma 12 y codifica a las isoenzimas GAB y LGA (Aledo *et al.*, 2000). Tiene una longitud superior a 18 kb y posee 18 exones (Aledo *et al.*, 2000; Pérez-Gómez *et al.*, 2003). Los exones 3-17

de los mRNA de KGA y GAB/LGA poseen la misma longitud y muestran una gran homología de secuencia (Pérez-Gómez *et al.*, 2003). Las principales diferencias entre las secuencias codificantes de ambos genes, aparte del exón 19 presente en el gen GLS y ausente en el gen GLS2, están localizadas en los exones 1 y 18. El exón 1 de isoenzimas que derivan del gen *GLS2*, GAB y LGA, contiene un motivo LXXLL de interacción con receptores nucleares, que podría explicar la localización nuclear que nuestro grupo ha demostrado en cerebro de mamíferos (Olalla *et al.*, 2002). El exón 18 que codifica para la región C-terminal en las isoenzimas KGA, GAB y LGA, presenta una homología de secuencia baja. Los aminoácidos codificados por este exón en la isoenzima GAB humana están implicados en el reconocimiento de módulos de interacción PDZ (Olalla *et al.*, 2001). De esta forma, existen diferencias significativas en las secuencias de regiones implicadas en la señalización y el transporte de proteínas a orgánulos celulares y su interacción con otras proteínas, que podría explicar las distintas funciones que estas isoformas pueden desempeñar. PDZ es un acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas en donde se encontró inicialmente este dominio: proteína de densidad postsináptica (PSD95), una proteína supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA), y la proteína *zonula occludens-1* (ZO-1).

El análisis de las secuencias de los genes humanos de GA sugiere que han evolucionado a partir de un gen ancestral común (Pérez-Gómez *et al.*, 2003), como se ha sugerido también para los genes de rata (Chung-Bok *et al.*, 1997). Así pues, los genes parálogos, *Gls* y *Gls2*, pudieron surgir por duplicación génica, seguida de cambios graduales en las secuencias de ambas copias. Genes ortólogos a los genes humanos *GLS* y *GLS2* se han descrito en ratón y rata (Mock *et al.*, 1989; Chung-Bock *et al.*, 1998). Resulta interesante destacar que las proteínas parálogas pueden adquirir diferentes funciones durante su evolución, aun conservando una gran similitud de secuencia y estructura tridimensional (Márquez *et al.*, 2009).

Las isoenzimas GA difieren en su estructura y en sus propiedades cinéticas, inmunológicas y reguladoras. Recientemente, nuestro grupo de

investigación demostró la co-expresión de las dos isoenzimas codificadas por el gen *Gls2* (GAB y LGA) en humanos, rata y ratón (Martín-Rufián *et al.*, 2012). Las dos isoformas *Gls2* surgen como consecuencia de la existencia de un sitio alternativo de inicio de la transcripción, situado en el intrón 1 del gen *Gls2*, a una distancia de 7 kb del promotor del transcrito canónico GAB.



**Fig. 3. Genes de glutaminasa humana *GLS* y *GLS2* y transcritos alternativos *KGA*, *GAC*, *GAB* y *LGA*.**

Los transcritos de mRNA del gen *Gls2* presentan una clara expresión en cerebro de mamíferos. Estudios recientes realizados por nuestro grupo, revelaron que el transcrito LGA es más abundante en cerebro de ratón mientras que GAB lo es en rata (Martín-Rufián *et al.*, 2012). Sin embargo, en cerebro, el transcrito KGA fue claramente el más abundante, representando más del 90% del total de los transcritos GA, tanto en rata como ratón (Martín-Rufián *et al.*, 2012).

Por otra parte, podríamos mencionar que los DNA complementarios (cDNAs) de KGA y GAC en rata y humano contienen repeticiones variables de CAG en su extremo 5'. Las repeticiones CAG codifican para la síntesis de poli-Gln que puede dar lugar a la agregación de la proteína codificada y posible daño del tejido neural (Márquez *et al.*, 2012).

Tradicionalmente se había considerado que los microsatélites eran marcadores evolutivamente neutros que carecían de una función específica, y que formaban parte del denominado "DNA basura" (Selvin *et al.*, 2007). Las enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de nucleótidos pueden agruparse en dos categorías, aquellas en las que la repetición se encuentra localizada en un exón, y aquellas otras en las que se localiza en regiones no codificantes. Se cree que el aumento en el número de residuos de Gln genera cambios conformacionales en la proteína que le proporcionan una ganancia de función y le confieren propiedades tóxicas. Al parecer, las proteínas anómalas no pueden ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma y se acumulan en inclusiones citoplasmáticas (Wood *et al.*, 1998). Se cree que los cambios conformacionales de la proteína anómala le permitirían establecer nuevas interacciones con otras proteínas celulares, produciendo el secuestro de las mismas en estos agregados (Simon *et al.*, 2001). A pesar de la especulación científica, el significado funcional de estas repeticiones en el extremo 5' de GLS está aún por descubrir.

En células cancerosas, las isoenzimas GA juegan un papel importante en la bioenergética tumoral. Las células tumorales reprograman su metabolismo con objeto de satisfacer tres importantes funciones: obtención de energía, aumento de biomasa y protección redox. Esta reprogramación metabólica de la célula tumoral se caracteriza principalmente por dos cambios principales: glicolisis aerobia incrementada en lugar de fosforilación oxidativa (OXPHOS) para el catabolismo de la glucosa y un incremento en la dependencia de Gln (Hsu y Sabatini, 2008).

Existen mecanismos de regulación diferentes para la expresión génica de estas isoenzimas en tumores. La sobreexpresión de GA es una característica fenotípica que manifiestan muchos tumores experimentales y cánceres humanos. Muchos estudios sugieren que las isoenzimas derivadas de los genes GLS y GLS2 podrían desempeñar papeles diferentes a los meramente catalíticos en la progresión tumoral. El gen GLS comúnmente está sobreexpresado en muchos tipos de tumores y se ha relacionado de forma positiva con la proliferación y el grado de malignidad tumoral (Lobo *et al.*, 2000). Estudios realizados en células P-493 de linfoma B humano y células PC13 de cáncer de próstata describen el mecanismo de regulación del gen GLS por el oncogén c-Myc (Gao *et al.*, 2009). Los genes Myc pertenecen a una familia de proto-oncogenes activadores de la tumorigénesis y que están sobreexpresados en numerosos tipos de cáncer (Albihn *et al.*, 2010). La inducción de la isoenzima KGA en estos cánceres proviene de un mecanismo postranscripcional que implica la unión de dos micro-RNAs, mir-23a y mir-23b, en la zona 3' UTR del gen GLS (Gao *et al.*, 2009), lo que lleva a la inhibición de su expresión. La sobreexpresión de c-Myc en células tumorales conduce a la supresión de la síntesis de los micro-RNAs anteriormente mencionados y a un aumento de KGA. Como consecuencia, se produce un incremento en el catabolismo de la Gln propio de las células tumorales. Mientras el gen GLS está regulado por el oncogén c-Myc, y por lo tanto asociado a proliferación y tumorigénesis, el gen GLS2 está controlado por proteínas de la familia del gen supresor tumoral P53 (Hu *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Velletri *et al.*, 2013), por lo que parece asociarse con estados no proliferativos o de quiescencia celular (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). El factor de transcripción P53 activa la transcripción de GLS2, promoviendo el metabolismo de Gln y la generación de glutatión que reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como un mecanismo de protección frente al desarrollo de tumores (Hu *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010). Los autores de estos trabajos sugieren que el aumento en la capacidad anti-oxidante debido al incremento del nivel de glutatión por GLS2, podría ser clave en los efectos mediados por P53, de esta forma se podría calificar a GLS2 como un potencial supresor tumoral con funciones antagónicas a GLS.

La expresión de la isoenzima GAB está reprimida en ciertos tipos de cáncer (Szeliga *et al.*, 2005). Recientemente, se ha publicado que la sobreexpresión de GLS2 en la línea T98G de glioblastoma humano (línea T98G-GAB) conduce a una reversión del fenotipo tumoral *in vitro*. De esta forma, la línea T98G-GAB tienen menor tasa de proliferación y capacidad invasiva, y se muestran menos malignas que la línea parental de la que derivan (T98G), aunque los mecanismos que regulan estos cambios son todavía desconocidos (Szeliga *et al.*, 2009). En células de carcinoma hepatocelular (HCC), la expresión de GLS2 es también muy reducida y su sobreexpresión en esta línea celular redujo la formación de colonias (Suzuki *et al.*, 2010), resultados que están en la misma línea que los comentados para los gliomas.

### **1.3 Al menos tres isoenzimas GA se expresan en el cerebro de mamíferos**

El modelo tradicional de expresión de GA postulaba que la única isoenzima presente en cerebro, responsable de la generación del neurotransmisor Glu, era la isoforma KGA (Curthoys y Watford, 1995). Nuestro grupo fue el primero en descubrir la expresión simultánea de transcritos de mRNA para KGA y GAB en cerebro humano (Aledo *et al.*, 2000; Gómez-Fabre *et al.*, 2000). Posteriormente, demostramos la co-expresión de mRNA de KGA y GAB en cerebro de otras especies de mamíferos como vaca, ratón, conejo y rata (Olalla *et al.*, 2002). La co-expresión fue confirmada a nivel de proteínas, empleando métodos bioquímicos e inmunológicos y anticuerpos isoenzima-específicos.

Tres isoenzimas GA se expresan en el cerebro de mamíferos: KGA, GAB y LGA (Olalla *et al.*, 2002; Martín-Rufián *et al.*, 2012). Es de destacar que la expresión de isoenzimas Gls2 (GAB y LGA) se ha detectado no sólo en hígado y cerebro de tejidos adultos, sino también en páncreas (Gómez-Fabre *et al.*, 2000), células tumorales (Turner y McGivan, 2003; Pérez-Gómez *et al.*, 2005), y células del sistema inmune (Castell *et al.*, 2004) (Tabla 1).

Mediante inmunotinción doble realizada con anticuerpos específicos frente a las isoformas KGA y GAB, se puso de manifiesto que ambas colocalizan

en numerosas células de diferentes regiones del cerebro de mamíferos (Olalla *et al.*, 2002). A pesar de estas evidencias experimentales, algunos trabajos relacionados con la homeostasis del ciclo Gln/Glu en cerebro aún ignoran la presencia de isoenzimas Gls2. Un ejemplo claro se encuentra en estudios realizados con ratones transgénicos *knockout* (KO) para el gen *Gls*. Estos ratones mueren poco tiempo después de su nacimiento; sin embargo, al anular la expresión de isoformas Gls (KGA + GAC) se observó una disminución en el flujo excitador postsináptico en neuronas, aunque se mantuvo la actividad glutamatérgica en neuronas fetales de estos ratones mutantes nulos. No se encontró en cultivos de neuronas corticales esa sutil disminución en las corrientes excitatorias postsinápticas, detectándose niveles adecuados de Glu intrasináptico y una actividad sináptica normal en neuronas carentes de estas isoformas (Masson *et al.*, 2006). Para explicar estos resultados inesperados, los autores sugieren que existen otras vías operativas para la síntesis de Glu, como reacciones de transaminación o mediante la recaptación neuronal directa del Glu. Sin embargo, omiten la existencia de isoenzimas *Gls2* como un posible mecanismo compensatorio para la síntesis del neurotransmisor Glu en ratones KO nulos para Gls (Márquez *et al.*, 2009).

Además de la expresión de isoformas Gls2 en cerebro de mamíferos, otro hallazgo inesperado se obtuvo en relación a la localización subcelular de GA en neuronas. Tradicionalmente, las isoenzimas GA han sido encontradas siempre en localizaciones mitocondriales, un hecho confirmado ampliamente por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-KGA y anti-mitocondria usando microscopía láser confocal y microscopía electrónica (Olalla *et al.*, 2002; Eid *et al.*, 2006). La localización de esta isoforma en la mitocondria fue reportada previamente por otros autores en cerebro de mamíferos (Aoki *et al.*, 1991; Laake *et al.*, 1999;). Sin embargo, técnicas inmunocitoquímicas en cerebro de rata y mono revelaron inesperadamente que la inmunotinción de Gls2 se concentró en mitocondrias y en núcleos neuronales (Olalla *et al.*, 2002). Así, nuestro grupo de investigación demostró por primera vez una localización extramitocondrial de la GA en mamíferos, rompiendo con el paradigma previamente establecido que

consideraba a las GA como enzimas exclusivamente mitocondriales (Kovacevic y McGivan, 1983; Curthoys y Watford, 1995).

Las características fisiológicas, funcionales y estructurales más representativas de cada isoforma GA se resumen en la Tabla 1.

<b>Nombre transcrito/proteína</b>	<b>KGA</b>	<b>GAC</b>	<b>GAB</b>	<b>LGA</b>
<b>Gen</b>	<i>GLS</i>	<i>GLS</i>	<i>GLS2</i>	<i>GLS2</i>
<b>Longitud del transcrito</b>	18 exones/ 4348 nt	15 exones/ 3183nt	18 exones/ 2408nt	17exones/ 2026nt
<b>Mecanismo transcripcional</b>	Ayuste alternativo	Ayuste alternativo	Canónica	Inicio alternativo de transcripción y promotor alternativo
<b>Regulación transcripcional</b>	c-Myc	—	p53	—
<b>Expresión</b>	Ubicua en mayoría de tejidos extra-hepáticos de mamíferos	Músculo cardiaco, páncreas, placenta, riñón, pulmón y células de cáncer	Hígado, cerebro, páncreas, sistema inmune y células de cáncer humano	Hígado, cerebro, páncreas, sistema inmune y células de cáncer humano
<b>Número de residuos</b>	669 aa	598 aa	602 aa	565 aa
<b>Dependencia de fosfato inorgánico (Pi)</b>	Alta	Alta	Baja	Baja
<b>Activación por amonio</b>	No	No	Baja	Fuerte
<b>Inhibición por Glu</b>	Fuerte	—	Moderada	No

En cerebro, una gran variedad de factores endógenos y exógenos pueden modular la actividad GA. El  $\text{Ca}^{2+}$  activa la GA en mitocondrias y sinaptosomas, rodajas de cerebro y homogenados, aunque no parece actuar sobre la enzima purificada, indicando claramente que este efecto es indirecto (Erecinska *et al.*, 1994; Kvamme *et al.*, 2000). Se sabe que el fosfato inorgánico (Pi) es el activador principal para la actividad *in vitro* de las enzimas mitocondriales GAC y KGA (Cassago *et al.*, 2012), si bien se desconoce si su efecto es fisiológico “in vivo” en cerebro. Las isoenzimas KGA y GAC se encuentran en su mayoría como dímeros inactivos que tienden a formar un tetrámero activo en presencia de Pi (Godfeyz

*et al.*, 1977; Morehouse y Curthoys, 1981). El análisis de la estructura cristalina del tetrámero GAC reveló que la tetramerización y la afinidad de la enzima hacia el sustrato son eventos dependientes de la concentración de Pi. Bajo estas condiciones, las isoformas KGA/GAC son las más eficientes en la hidrólisis de Gln en presencia de Pi (Cassago *et al.*, 2012).

#### **1.4 Proteínas que interactúan con GA en cerebro**

Recientemente, se han descubierto proteínas que interactúan con GA en cerebro de mamíferos. Caracterizar el conjunto global de interacciones entre proteínas en un organismo representa un nivel de complejidad superior al de proyecto Genoma Humano, consistente en secuenciar toda la dotación genética del ser humano. El análisis de las interacciones entre proteínas es muy importante porque amplifican enormemente el abanico de funciones que una proteína puede desempeñar en un ser vivo. Así, las interacciones entre proteínas constituyen la base de múltiples mecanismos fundamentales que regulan tareas esenciales en las células, como el envío de proteínas a diferentes orgánulos y la formación y ensamblaje de agregados multiproteicos.

Con el fin de descubrir posibles nuevas funciones fisiológicas de isoenzimas GA en cerebro, se realizaron estudios para aislar proteínas que interactúan con GA. Mediante rastreo de doble híbrido en levaduras utilizando como cebo la región C-terminal de la GAB humana, se aislaron dos cDNAs de cerebro humano que codifican para proteínas que contienen dominios PDZ: alfa-1-sintrofina (SNT) y la *Glutaminase-Interacting Protein* (GIP) (Olalla *et al.*, 2001). Los dominios PDZ se unen a secuencias cortas del extremo C-terminal de sus proteínas diana, facilitando así la formación de complejos funcionales específicos.

La proteína GAB humana posee en la región C-terminal al menos cuatro aminoácidos, ESMV, que coinciden con la secuencia requerida para la interacción con proteínas PDZ (Ponting *et al.*, 1997). La unión clave de los residuos aminoacídicos de GAB en la región C-terminal con dominios PDZ de GIP y SNT ha

demostrado ser una interacción muy específica, tanto en ensayos genéticos *in vivo* en levaduras como empleando técnicas de precipitación por afinidad (Olalla *et al.*, 2001). Las proteínas GIP y SNT se expresan ampliamente en cerebro de mamíferos, particularmente en astrocitos, donde se encuentran en procesos y pies perivasculares (Olalla *et al.*, 2008).

Las SNTs son una familia de proteínas adaptadoras que unen y anclan proteínas de señalización. La familia de las SNTs comprende cinco isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ) que se expresan en músculo esquelético, corazón, cerebro y otros tejidos humanos (Ahn *et al.*, 1996). En cerebro, el dominio PDZ de SNT se une a proteínas quinasas y a la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS; EC 1.14.13.39): se ha sugerido que estas interacciones participan en un mecanismo de tráfico selectivo de proteínas a localizaciones subcelulares (Suzuki y Takeda, 2001). En astrocitos, se ha demostrado que SNT es un organizador del complejo proteico de distrofinas. En cerebro, las distrofinas se encuentran predominantemente en las sinapsis, donde las células nerviosas conectan unas con otras, y también en las paredes de los vasos sanguíneos y en la barrera hemato-encefálica (Bragg *et al.*, 2006). La proteína SNT es la proteína PDZ mejor caracterizada en astrocitos, y se concentra en los pies perivasculares anclando a la AQP4, un canal de agua, a estas membranas (Neely *et al.*, 2001). El acoplamiento entre AQP4 y SNT puede ser indirecto y estudios recientes han sugerido que proteínas de anclaje adicional (¿quizás GIP?) son necesarias para la agrupación de AQP4 en los pies perivasculares de astrocitos en cerebro (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

En la actualidad, el papel funcional de la proteína GIP en los pies astrocitarios perivasculares se desconoce, así como si GIP o SNT pueden actuar como adaptadores de la GA. Por otro parte, como ya hemos mencionado en el apartado 1.2, la interacción de la región C-terminal de GAB humana con proteínas PDZ puede sugerir un mecanismo molecular para explicar su traslocación nuclear. Podría proponerse que SNT o GIP pueden contribuir a determinar la localización subcelular de GA en ciertas regiones del cerebro,

creando así un mecanismo de envío y/o regulación de la GA. Un mecanismo similar ha sido reportado para la isoenzima KGA en cerebro mediado por su interacción con la proteína caitaxina (Buschdorf y col., 2006). La proteína caitaxina mostró un patrón de expresión similar a KGA en mitocondrias de la línea celular de ratones PC12 (feocromocitoma de médula adrenal), estimuladas con un factor de crecimiento nervioso (NGF) por 24 horas, que induce diferenciación celular. Después de co-transfectar estas células con KGA y caitaxina, caitaxina distribuye a KGA desde procesos celulares a neuritas terminales y, por tanto, el tráfico neuronal de KGA se adscribe a su interacción específica con caitaxina (Buschdorf *et al.*, 2006). Estos autores demostraron además que caitaxina redujo los niveles de Glu por inhibición de la actividad KGA. Es así como la neurotransmisión glutamatérgica y el desarrollo neuronal podrían estar regulados por esta nueva interacción (Marquez *et al.*, 2009).

La proteína GIP contiene un único dominio PDZ que abarca los residuos 17-112 de su secuencia (124 residuos en total). Aunque un único dominio PDZ también puede llegar a ser funcional, los miembros de la familia PDZ usualmente tienen dos o más repeticiones de estos motivos, de acuerdo con su función de proteínas que sirven como andamios para anclar y ensamblar complejos multiproteicos. En este sentido, GIP sólo posee un dominio PDZ que representa casi la totalidad de su estructura primaria. No obstante, GIP puede asociarse formando dímeros, puede unirse a la región C-terminal de sus dianas proteicas, a otros dominios PDZ y a motivos de reconocimiento adyacentes a estos motivos PDZ, incluso, puede asociarse a motivos de reconocimiento no canónicos de proteínas que carecen de la clásica secuencia de reconocimiento C-terminal; por todo lo anterior, varias proteínas podrían ser simultáneamente reconocidas por GIP de acuerdo con su función principal de proteína adaptadora (Aledo *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 2008; Zoetewey *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013).

Nuestro grupo ha realizado estudios estructurales de la proteína GIP humana combinando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución, espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular (DC)

(Banerjee *et al.*, 2008). Partiendo de esos resultados, hemos demostrado que GIP posee una estructura secundaria formada por dos hélices  $\alpha$  y 6 láminas  $\beta$  (Figura 2). El dominio PDZ une la región C-terminal de la proteína diana en un surco alargado, denominado surco de unión PDZ, situado entre la segunda hélice- $\alpha$  y la segunda lámina- $\beta$ . El dominio PDZ proporciona una región hidrofóbica que refuerza y hace más selectiva la unión al formar enlaces de hidrógeno entre las amidas de la cadena principal y el carboxilato C-terminal del péptido sustrato (Zoetewey *et al.*, 2011). El péptido C-terminal de la GAB (KENLESMV) fue utilizado en nuestros estudios de interacción con GIP. La adición de la diana peptídica a GIP originó una significativa disminución en la fluorescencia intrínseca de la proteína GIP. El efecto de la unión del ligando en la estructura secundaria de GIP también fue investigado por DC, confirmándose también por esta técnica que la unión de GIP a su ligando es un efecto alostérico (Banerjee *et al.*, 2008; Zoetewey *et al.*, 2012).



**Figura (3): Modelo de la estructura secundaria de la proteína humana GIP.** Se muestran las 6 láminas  $\beta$  y las 2 hélices  $\alpha$ . Los residuos His-90 y Trp-83 (eje interno expuesto a la hendidura) también se aprecian. (Tomado de Banerjee *et al.*, 2008).

La diversidad de las interacciones PDZ y su intervención en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas normales de las células son de una gran importancia. Un gran número de patologías humanas se generan por una disfunción o interacción atípica e inapropiada entre proteínas que afectan los principales procesos biológicos.

La proteína  $\beta$ -catenina (importante en vías de señalización Wnt/*wingless*) está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos como migración celular, polaridad, proliferación y muerte celular. Se asocia con TCF-4 (factor de transcripción 4) para regular la expresión de genes Wnt, incluyendo el oncogen c-Myc (Kanamori *et al.*, 2003). Este factor de transcripción se asocia física y funcionalmente con GIP mediante su dominio PDZ, inhibiendo su capacidad transcripcional y reduciendo la proliferación de células de cáncer colorrectal (Kanamori *et al.*, 2003). La sobreexpresión de la proteína GIP está relacionada directamente en procesos invasivos de cáncer de mama (Han *et al.*, 2012). El uso de ratones modelo ortópicos y heterotópicos, inoculados con líneas celulares de glioblastoma humano (D54 y U87) y *knockdown* para el mRNA de GIP, demostraron que GIP facilita la capacidad invasiva del tumor inducida por la angiogénesis (Miaojun *et al.*, 2013). Los ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron que GIP utiliza múltiples vías, incluyendo la modulación de la expresión génica de fibronectina 1 y la secreción de la proteína uPA (factor angiogénico) para establecer o mantener un microambiente pro-angiogénico dentro del tumor (Miaojun *et al.*, 2013).

Se han descrito interacciones de GIP con algunas proteínas que regulan la actividad de GTPasas (como ARHGEF16 y Rho activador de rotequinas), que intervienen en procesos como la citocinesis, transcripción, crecimiento y transformación celular. También se ha descrito la asociación de GIP con FAS, un miembro de la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral alfa) (Zoetewey *et al.*, 2011), y con proteínas relacionadas con procesos virales oncogénicos como HPV16-E6 y HTLV-1 Tax. En cerebro, GIP se asocia a una proteína inhibidora de angiogénesis específica de este órgano denominada BAI2. Todas estas proteínas contienen la secuencia consenso de unión C-terminal (E-S-X-V-COOH) (Zoetewey *et al.*, 2011).

Trabajos recientes amplían la diversidad de funciones adscritas a GIP. Se han identificado dos nuevas proteínas de interacción: *Deltex homolog 1* (DTX1), importante en angiogénesis, linfogénesis, miogénesis y diferenciación celular

(Zhang *et al.*, 2010) y una proteína de unión a RNA de doble cadena *Staufen homolog 1* (STAU1), también implicada en procesos de transporte celular y un componente crítico en el mantenimiento neuronal (Zencir *et al.*, 2013). Ambas proteínas se unen a GIP a través de un motivo de reconocimiento interno, ya que carecen de la clásica secuencia de reconocimiento C-terminal (Zencir *et al.*, 2013).

### **1.5 Expresión de GIP en cerebro de mamíferos**

La hipótesis relativa a que la GA en cerebro esté regulada por proteínas PDZ es muy interesante, porque puede proporcionar un mecanismo útil de control de la síntesis de Glu y también podría explicar el transporte de la GA cerebral a distintos compartimientos celulares. De hecho, se ha demostrado que GIP inhibe la actividad de la isoenzima LGA en extracto total de hígado de rata (Aledo *et al.*, 2001). Más Aún, se ha demostrado que la interacción con proteínas PDZ permite a ciertas proteínas ser enviadas a sus localizaciones subcelulares, incluyendo el núcleo (Olalla *et al.*, 2008; Márquez *et al.*, 2006). Como hemos mencionado anteriormente, las isoenzimas que derivan del gen *Gls2* poseen un motivo LXXLL de interacción con receptores nucleares en su región próxima al extremo N-terminal, lo que podría explicar la localización nuclear que nuestro grupo ha demostrado previamente para esta isoenzima (Olalla *et al.*, 2002; Kausalya *et al.*, 2004). Para comprobar la relevancia fisiológica de la interacción GA-GIP, se llevaron a cabo estudios de la expresión de GIP en cerebro de mamíferos, tratando de correlacionar su expresión con patrones conocidos de expresión de *Gls2* (Olalla *et al.*, 2002) y SNT (Neely *et al.*, 2001).

El mRNA de GIP se expresó en todas las regiones del cerebro humano con un nivel de intensidad similar, excepto en la médula espinal donde la señal fue más intensa (Olalla *et al.*, 2008). Los estudios relacionados con la localización celular y subcelular de GIP en cerebro de rata y mono se efectuaron por inmunocitoquímica. Demostramos una inmunotinción prominente en regiones cerebrales tales como corteza cerebral, hipocampo, estriado y bulbo olfatorio, mientras que cerebelo, tálamo y la medula oblonga fueron teñidos más

ligeramente (Olalla *et al.*, 2008). La distribución celular de la proteína GIP mostró su presencia tanto en neuronas como en células gliales en todas las regiones cerebrales analizadas, con una localización citosólica y mitocondrial. Los resultados revelaron que las células gliales GIP-positivas fueron astrocitos. El patrón de tinción del antígeno GIP se encontró en cuerpos celulares de astroglia y procesos gliales, incluyendo los pies perivasculares. En otras células gliales como microglía y oligodendrocitos no se encontró inmunotinción para GIP (Olalla *et al.*, 2008).

Mediante inmunohistoquímica con doble marcaje para las proteínas GIP y GAB, empleando anticuerpos específicos, intentamos demostrar si ambas colocalizan en cerebro de mamíferos, como requisito previo para elucidar si ambas pueden interactuar *in vivo*. En astrocitos, GIP colocaliza con GAB como se demostró utilizando técnicas de microscopía confocal en corteza cerebral de cerebro de rata. El estudio de doble marcaje demostró que ambas proteínas colocalizan en cuerpos celulares y prolongaciones (procesos) de astrocitos, incluyendo los pies perivasculares. La presencia de GIP en astrocitos también fue confirmada por inmunocitoquímica, que reveló inmunoreactividad en pies astrocitarios perivasculares y en células endoteliales (Olalla *et al.*, 2008). También se encontró la presencia de GIP en el citoplasma de procesos celulares de astrocitos, pero una asociación con orgánulos celulares o membranas no pudo ser apreciada.

Sin embargo, la relevancia fisiológica de la interacción entre GA y otras proteínas, así como su implicación en trastornos neurológicos, queda por elucidar. Asimismo, es aún desconocida cuál es la función que realiza la proteína PDZ GIP en cerebro, por lo que en esta memoria quisimos realizar un estudio de las potenciales proteínas que interactúan con ella.



## *Objetivos*

## **2. OBJETIVOS**

De acuerdo con la información suministrada en la introducción y en consonancia con la línea de investigación de nuestro grupo, orientada a dilucidar el papel de las isoenzimas de GA en el cerebro de mamíferos, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1. Analizar la expresión de isoenzimas GA en cerebro de mamíferos, con énfasis en poblaciones astrogliales.***
- 2. Estudiar la función nuclear de la isoenzima GAB en líneas celulares de cáncer humano.***
- 3. Caracterizar el interactoma nuclear de la proteína GIP en cerebro de mamíferos.***

## *Materiales y métodos*

### **3. Metodología experimental**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Productos empleados**

Las sales y productos empleados para preparar las soluciones, tampones y medios fueron de Sigma (España) y Merck-Millipore (Alemania). Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado “reactivo análisis”.

Para los medios de cultivo de bacterias se empleó bactotripton y extracto de levadura de Scharlab (España). El agar fue de la casa Sigma (España).

Todas las enzimas de restricción se adquirieron de la casa Fermentas (Lituania).

Los 2'-desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), fueron suministrados por la casa Roche (Alemania), así como el antibiótico ampicilina.

Los medios MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco) y DEMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), el suero fetal bovino (FCS), los antibióticos penicilina/estreptomicina, y el fungicida anfotericina, empleados en el cultivo de células, fueron suministrados por BioWhittaker (USA) o Sigma (España).

En las inmunoprecipitaciones se usó el kit comercial  $\mu$ MACS Protein G MicroBeads de la casa Miltenyi Biotec (Alemania).

##### **3.1.2 Equipamiento**

Las células animales que se han utilizado en esta memoria fueron mantenidas en incubadores de CO<sub>2</sub> marca Heraeus (Alemania), modelos 6000 y B5060.

Todas las manipulaciones de células animales en cultivo se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar vertical de alta seguridad, clase II, marca Heraeus, modelo HB 2472.

La cabina de flujo laminar empleada en la manipulación de cultivos bacterianos fue de la marca Kowell (USA).

La centrifugación de las células se llevó a cabo en una centrífuga refrigerada marca Heraeus modelo Biofuge 28 RS. Otras centrífugas empleadas fueron los modelos Biofuge 13 y Biofuge Pico de Heraeus.

El recuento de las células se llevó a cabo con un contador electrónico marca Coulter (Inglaterra) modelo ZM o, alternativamente, empleando una cámara de Neubauer Improved (Alemania).

Para la visualización de las células se utilizó un microscopio invertido dotado de contraste de fase marca Nikon (Japón), modelo Diaphot-TMD.

Las células fueron almacenadas en nitrógeno líquido en un contenedor Dewar marca Telstar (España).

La esterilización de todo el material se hizo en un autoclave automático marca Matachana (España), modelo 80 LR-1.

La estufa usada para secar y esterilizar el material de vidrio fue de la marca Heraeus modelo D 6450.

Las micropipetas empleadas fueron de la marca Labmate de HTL (High Tech Lab) (USA), modelos LM 20, LM 200 y LM 1000 y de la marca Eppendorf (Alemania), modelo P-10.

La extracción de los líquidos de desecho (medios de cultivo, soluciones de lavado, etc...) se realizó con una bomba de vacío marca Dinko (España).

Para las diferentes pesadas se empleó una balanza electrónica monoplano de la marca Mettler (Suiza), modelo PJ-400, cuya sensibilidad es  $10^{-2}$  g.

Las medidas de pH se efectuaron con un pHmetro marca Radiometer (Dinamarca), modelo PHM 82, con una sensibilidad de  $\pm 0.1$  unidades de pH.

Las neveras y arcones empleados para la conservación de productos y células fueron: arcón congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  Revco (USA); arcón congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$  Frabelec (Dinamarca); cámara fría  $4^{\circ}\text{C}$  Koxka (España).

El termociclador utilizado para la retrotranscripción de RNAs y para la amplificación de segmentos de DNA por PCR fue de la marca Bio-Rad (USA), modelo iCycler.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron empleando espectrofotómetros de la casa Shimadzu (Japón), modelos UV- 120-02 y UV- 1800. Las cubetas de cuarzo para cuantificación de ácidos nucleicos fueron de la casa Sigma.

Las cubetas para las electroforesis de DNA y RNA fueron de la marca Bio-Rad, modelos mini subcell GT y subcell GT. La fuente de alimentación usada fue LKB 2197 (Suecia), o bien el modelo PowerPac Basic de la casa Bio-Rad.

Las incubaciones de las muestras se llevaron a cabo en baños termostatizados marca Raypa (España), modelo BA-2.

Se empleó un documentador de geles y un densitómetro de la casa Bio-Rad, modelos Gel Doc XR System y GS-800, respectivamente.

Se utilizó un espectrómetro de masas de trampa de iones con ionización ESI (*electrospray ionization*), modelo HCT ultra PMT Discovery System de la casa Bruker, acoplado a un nano-HPLC modelo 1200 Series de Agilent Technologies.

Para la visualización de dobles marcajes fluorescentes se utilizó Microscopio LEICA, mod. SP5 II y Microscopio LEICA, mod. TCS NT.

Para el análisis de los *ProteinChip*<sup>®</sup>*PS20 Array*, se usó un espectrómetro de masas SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight*), *ProteinChip Seldi System Personal Edition* de la firma Bio-Rad.

Para la unión covalente de los anticuerpos usados para análisis en SELDI-TOF y posterior captura de complejos proteicos, se usó el sistema de purificación y enriquecimiento proteico *ProteinChip*<sup>®</sup> *PS20 Array* de la firma Bio-Rad.

### **3.1.3 Material fungible**

Todo el material estéril utilizado para el cultivo de células (placas de cultivo, pipetas, puntas de micropipetas...) fue de un solo uso de las marcas Nunc (Dinamarca), Corning (USA) y Falcon (USA).

- ⊗ Todo el material de vidrio utilizado, particularmente el de uso estéril, fue de la marca Pyrex.
- ⊗ La esterilización de soluciones se llevó a cabo con filtros Millipore de 0.2 μm de tamaño de poro.
- ⊗ Las cubetas para la cuantificación espectrofotométrica de proteínas fueron de la marca Sarstedt (Alemania).

### **3.2 Esterilización de soluciones y materiales**

Para las técnicas de Biología Molecular, las soluciones, medios de cultivo y agua se esterilizaron en autoclave en ciclo húmedo a 120° C durante 20 minutos.

Las soluciones que tenían componentes termosensibles se filtraron a través de membranas esterilizadas de 0.22 μm de tamaño de poro (Millipore).

### 3.3 Material biológico empleado

#### 3.3.1 Cepas de *E. coli* utilizadas

- ⊗ **DH5α:** cepa de *E. coli* frecuentemente usada para clonación rutinaria; además, proporciona un mecanismo de selección por color azul/blanco. Estas bacterias son *recA*<sup>-</sup>, deficientes en recombinación, para así evitar fenómenos de recombinación homóloga que puedan provocar cambios en las secuencias de los genes dianas clonados en el plásmido, y *endA*<sup>-</sup>, deficientes en endonucleasa, para evitar degradaciones del DNA plasmídico. Se consigue una elevada eficiencia de transformación y un alto rendimiento al extraer el plásmido recombinante.
  
- ⊗ **BL21:** esta cepa está indicada para la expresión de proteínas recombinantes, por carecer de la proteasa lon y de la proteasa de membrana externa ompT, que pueden degradar proteínas durante la purificación. Proveen diversos mecanismos de control diferente sobre vectores que contienen el promotor del fago T7.
  
- ⊗ **BL21DE3:** además de cumplir con las características anteriormente nombradas, esta cepa es lisogénica para el bacteriófago DE3. Dicho bacteriófago es un derivado de lambda que porta la región de inmunidad del fago 21, un fragmento de DNA con el gen *lacl*, el promotor *lacUV5* y el gen RNA polimerasa T7. En una cepa lisogénica para DE3, el único promotor capaz de reproducir la transcripción de la RNA polimerasa del T7 es el *lacUV5*, que además es inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). De esta manera, cuando se añade IPTG al cultivo, se induce la RNA polimerasa del T7, con lo cual se producirá también la transcripción de DNA clonado en el vector pET3c.

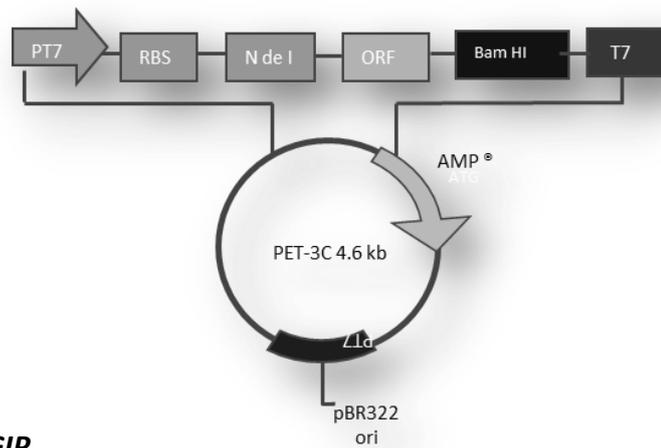
### 3.3.2. Vectores de expresión y construcciones utilizadas en este trabajo

Construcciones previas				
Nombre	Inserto	Ori	Resistencia	Vector
<b>pET3c-GAB</b>	Secuencia codificante completa de la GAB <sub>1-602</sub> aa. (NdeI/BamHI).	pBR322	Amp <sup>R</sup>	PET-3C (Novagen)
<b>pQE-31</b>	Secuencia codificante completa de la proteína GIP <sub>1-124</sub> (Glutaminase-Interacting Protein), (BamHI/ HindIII).	Col E1	Amp <sup>R</sup>	PQE-31 (Qiagen)
<b>pQE-KGA<sub>551-669</sub></b>	Región C-terminal de la secuencia codificante de KGA <sub>551-669</sub> (BamHI y HindIII).	Col E1	Amp <sup>R</sup>	PQE-31 (Qiagen)

Se utilizaron sistemas de expresión de proteínas de fusión, fácilmente purificables mediante cromatografía de afinidad. En concreto, se utilizaron construcciones realizadas anteriormente en nuestro laboratorio (Campos Sandoval, 2002).

#### ***pET-3c-GAB***

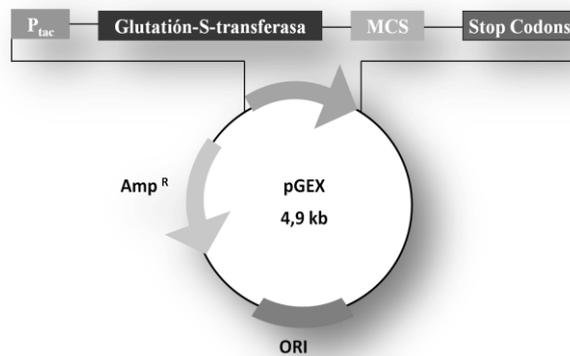
El vector posee un promotor inducible por IPTG; es decir, en presencia de este reactivo se activa la transcripción y la traducción de la secuencia de DNA hasta proteína, mientras que en su ausencia, tanto la transcripción como la traducción son inhibidas, pudiéndose así controlar a voluntad el momento en el cual queremos expresar nuestra proteína. Además posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina, lo que nos permitió seleccionar las bacterias transformadas con el plásmido de las no transformadas.



**pGEX-GIP**

Este vector permite la expresión de la proteína de interés fusionada por su extremo N-terminal a la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Se aprovecha la gran afinidad de esta proteína por el glutatión para purificar fácilmente la proteína de fusión generada.

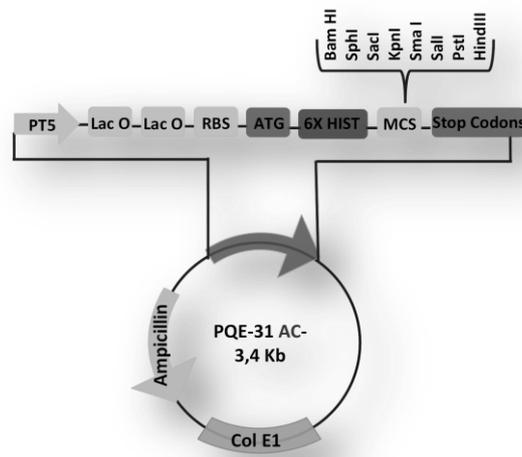
La secuencia codificante completa de la proteína GIP (*Glutaminase-Interacting Protein*, GenBank # AF234997) fue subclonada en el plásmido pGEX-6P-1, previamente digerido con EcoRI.



**pQE-31GIP<sub>1-124</sub>**

Este plásmido permite la expresión de la proteína de interés fusionada a seis residuos de histidina (6xHis) en su extremo amino terminal, de manera que se puede purificar fácilmente utilizando la afinidad de este fragmento por iones divalentes como el Ni<sup>2+</sup>.

El inserto correspondiente a la región codificante de GIP se introdujo en este vector en los sitios de restricción BamHI y HindIII del pQE-31.



### ***pQE-KGA<sub>551-669</sub>***

La secuencia correspondiente a los 119 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína KGA se insertó en sitios BamHI y HindIII del pQE-31.

### ***3.3.3 Animales de experimentación***

Las ratas Wistar machos, de 100-150 g de peso, se mantuvieron en el Estabulario del Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, bajo condiciones de temperatura media controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 14/10 horas luz/oscuridad. Durante el tiempo de permanencia en el animalario los animales tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentados con una dieta estándar.

### ***3.3.4 Líneas celulares de mamíferos***

En esta memoria se han utilizado principalmente 4 líneas celulares de cáncer humano:

- ⊗ Línea celular de glioblastoma humano T98G, línea celular de carcinoma hepatocelular humano HEPG2, y línea de neuroblastoma humano SHSY-5Y. Todas ellas fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, USA).
- ⊗ T98G-GAB. Línea celular derivada de una modificación genética de la anterior que expresa el cDNA conteniendo el marco abierto de lectura de la isoenzima GAB humana en orientación sentido. Esta línea fue

obtenida en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Jan Albrecht (Polonia) (Szeliga *et al.*, 2009).

- ⊗ SHSY-5Y-GAB. Se realizaron transfecciones transitorias de esta línea celular con dos vectores de expresión (pEGFP y pCMV-Myc) que contienen la secuencia codificante de la isoenzima GAB fusionada en el extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente EGFP (EGFP-N-GAB) y del epítipo c-Myc (Myc-N-GAB), respectivamente. Ambos plásmidos (pEGFP-N1 y pCMV-Myc-N1) se adquirieron de la casa comercial Clontech. Las transfecciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante del agente transfectante utilizado (FuGENE® *G/L Transfection Reagents*, Promega).

El protocolo seguido para la inserción del marco abierto de lectura de la GAB humana en ambos vectores se ha detallado previamente (Rubio López de la Oliva, 2013).

### **3.4 Métodos**

#### **3.4.1 Cultivo y almacenamiento de cepas de *Escherichia coli***

Para la multiplicación rutinaria de células de las diferentes cepas de *E. coli* se empleó medio de cultivo líquido LB (Luria-Bertani), compuesto por bacto triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (10 g/L). Para la obtención de colonias aisladas, las bacterias se cultivaron en placas de Petri con medio LB, al que se le añadió agar sólido a una concentración de 1.5 % (p/v) antes de su esterilización en el autoclave. Las bacterias transformadas con plásmidos se cultivaron en medio LB o LB-agar con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL.

Para la expresión de proteínas recombinantes, las bacterias transformadas se cultivaron en medio líquido YTA 2×, compuesto por

bactotriptona (16 g/L), extracto de levadura (10 g/L), NaCl (5 g/L) y ampicilina (100 µg/ml). Las células se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C en medio LB con glicerol al 15 % (v/v).

### **3.4.2 Preparación de células competentes**

Para la obtención de células competentes de la cepa deseada de *E. coli*, se inocularon 3 mL de medio LB con una colonia única procedente de una placa de cultivo y se incubaron a  $37^{\circ}$  C con agitación (200 rpm) durante toda la noche. A la mañana siguiente, se inocularon 50 mL de medio LB (en un matraz de 500 mL) con 200 µL del precultivo anterior. Este nuevo cultivo se dejó con agitación (200 rpm) a  $37^{\circ}$  C hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.6. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 2500 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}$  C y se resuspendieron en 15 mL fríos de  $MgCl_2$  100 mM. Tras centrifugar de nuevo a las mismas condiciones, las células se resuspendieron en 15 mL fríos de  $CaCl_2$  100 mM y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Finalmente se centrifugaron y se resuspendieron en 3 mL de  $CaCl_2$  100 mM con glicerol al 15% (v/v). La suspensión de bacterias competentes se dividió en alícuotas de 100 µL, que se guardaron a  $-80^{\circ}$ C hasta su uso.

### **3.4.3 Transformación de células competentes**

Las células competentes se transformaron con 10-50 ng de plásmido. Se descongelaron 100 µL de suspensión bacteriana y se incubaron en hielo durante 25 minutos con la cantidad indicada de plásmido. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico de  $42^{\circ}$ C durante 2 minutos. A continuación se les añadió 1 mL de medio LB a temperatura ambiente y se incubaron a  $37^{\circ}$ C durante 45 minutos. Después de centrifugar las bacterias, se resuspendieron en 100 µL de LB y se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina.

### 3.4.4 Cultivos de bacterias transformadas

La expresión de proteínas recombinantes se realizó utilizando las cepas de *E. coli* BL21 transformadas con las construcciones en los vectores pQE-31 y pGEX-6T1, y la cepa BL21 (DE)3 para las construcciones en el vector pET3c. Una vez obtenida la construcción de interés, el plásmido fue introducido en estas cepas de bacterias mediante transformación. Se tomó una colonia aislada y se dejó crecer en 50 mL de medio YTA 2X, durante toda la noche a 37°C y con agitación (200 rpm). Al día siguiente se crecieron cultivos líquidos en el mismo medio y a 37° C, con un volumen de 1L para aproximadamente 10 mg de proteína total en un Erlenmeyer de 2.5L. Cuando la densidad óptica del cultivo ( $A_{600\text{ nm}}$ ) estuvo entre 0.6 y 0.8, se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 0.1 ó 1 mM. A continuación, el cultivo se incubó a 23°C o 37°C con agitación durante 4 h más. Tras la inducción, centrifugamos la suspensión de bacterias a 8000 rpm en un rotor Beckman JA-10 a 4°C durante 10 minutos. Descartamos el sobrenadante y congelamos el precipitado bacteriano a -20°C hasta su utilización.

### 3.4.5 Expresión heteróloga de proteínas en *E. coli*

En la siguiente tabla, se encuentran las condiciones utilizadas para la inducción de las distintas proteínas recombinantes:

Proteína recombinante	Temperatura de inducción	Concentración de IPTG
GST-GIP	23° C	0.1 mM
His-GIP	37° C	1 mM
His- KGA <sub>551-669</sub>	23° C	1 mM
GAB <sub>1-602</sub>	37° C	1 mM

Una vez finalizado el proceso de inducción, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 10000 g y 4°C durante 10 minutos. El precipitado bacteriano se guardó a -20°C hasta su uso.

### **3.4.6 Aislamiento de DNA plasmídico**

Soluciones:

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Solución de lisis: SDS 1 % (p/v), NaOH 0.2 N.

Solución de neutralización: acetato potásico 3 M, pH 4.8.

Procedimiento:

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se llevó a cabo con el método de la lisis alcalina en presencia de SDS (Birnboim & Doli, 1979). Se obtuvieron cultivos saturados (densidad óptica a 600 nm igual a 1.2-1.4) de colonias aisladas de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-31-GIP. Se centrifugó un volumen de 3 mL de cada cultivo a 10000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado de bacterias se resuspendió en 100 µL de tampón TE. A continuación, se añadieron a la suspensión 200 µL de solución de lisis y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron al lisado 150 µL de solución de neutralización, se agitó por inversión y se dejó reposar en hielo durante 3 minutos.

La mezcla se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante, al que se le hizo una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1;v:v:v), seguida de otra con un volumen de cloroformo. El DNA plasmídico, contenido en la fase acuosa, se precipitó por adición de 270 µL de isopropanol. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70 % frío, se secó al aire y se resuspendió en 50 µL de tampón TE con 20 µg/mL de RNasa A. La solución de DNA plasmídico se incubó a 37°C durante 20 minutos y se guardó a -20°C. El rendimiento, en este caso, no pudo ser determinado por absorbancia a 260 nm, dado que la preparación aparecía contaminada con nucleótidos procedentes de la digestión del RNA.

### **3.4.7 Digestión del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción**

Para la digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción, la cantidad empleada por reacción osciló entre 500 ng y 3 µg de DNA. Al volumen de muestra se añadió 1/10 del volumen final de reacción del tampón adecuado, a partir de una disolución 10×. Se utilizaron entre 1 y 3 U de actividad enzimática por µg de DNA a digerir. La incubación típica fue de 2 h a 37°C.

En el caso de digestiones con dos enzimas, se llevaron a cabo de forma simultánea cuando los tampones de ambas enzimas fueron compatibles.

### **3.4.8 Cultivo y criopreservación de líneas celulares tumorales**

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa en medio MEM Y DMEN suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), penicilina (100 U.I./mL), estreptomycin (100 mg/mL), sulfato de geneticina (0.5 mg/mL), para mantenimiento de líneas transfectadas, y anfotericina (1.25 mg/mL). Los cultivos se incubaron a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

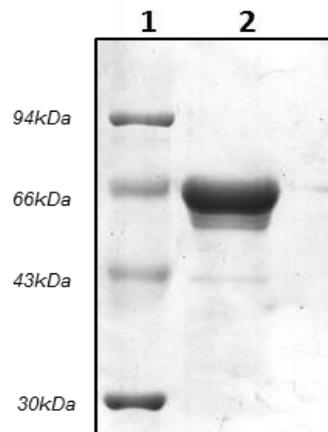
La criopreservación celular se hizo, previa separación de las células del soporte con tripsina, resuspendiendo las mismas a una concentración 10<sup>7</sup> células/mL en medio de cultivo al 10% (v:v) en dimetil sulfóxido (DMSO). Los viales se mantuvieron 20 minutos a 4°C, 2 h a -20°C, 12 h a -80°C y finalmente fueron almacenados en un contenedor de nitrógeno líquido. Con este procedimiento se consigue que la temperatura baje aproximadamente 1°C por minuto.

### **3.4.9 Purificación de proteínas recombinantes**

#### **3.4.9.1 Purificación de GAB**

La proteína recombinante GAB humana expresada en *E. coli* con el vector pET3c se purificó según el protocolo previamente publicado por nuestro grupo

(Campos et al., 2003). Una preparación típica de la proteína purificada se muestra en la Fig. 4.



**Figura (4) Proteína GAB electroeluida.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie donde se muestra la proteína GAB electroeluida (calle 2) y en el marcador de proteínas de baja masa molecular (calle 1).

#### 3.4.9.2 Purificación de proteínas fusionadas a etiqueta de 6 Histidinas

La cromatografía de afinidad aprovecha una propiedad única de una proteína de interés para separarla del resto de proteínas de un extracto. En teoría hay tantos métodos de purificación por afinidad como proteínas, pero en la práctica su número es reducido y la puesta a punto de estos métodos resulta difícil si no aprovechamos propiedades muy diferenciadas del resto de proteínas. En nuestro caso, se aprovecha la afinidad del  $\text{Ni}^{2+}$  por el grupo imidazol de la histidina, dado que las proteínas (GIP y KGA) se expresan con una extensión amino-terminal conteniendo 6 histidinas (6xHis). Esta técnica se denomina cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC) y la proteína queda retenida preferentemente a una resina que está formando un quelato con  $\text{Ni}^{2+}$ . La proteína se eluye de la columna mediante adición de un tampón con imidazol, compuesto que compite por el  $\text{Ni}^{2+}$  con el grupo imidazol de las histidinas de la etiqueta de afinidad y desplaza la proteína de la columna al llegar a una concentración determinada.

## Soluciones:

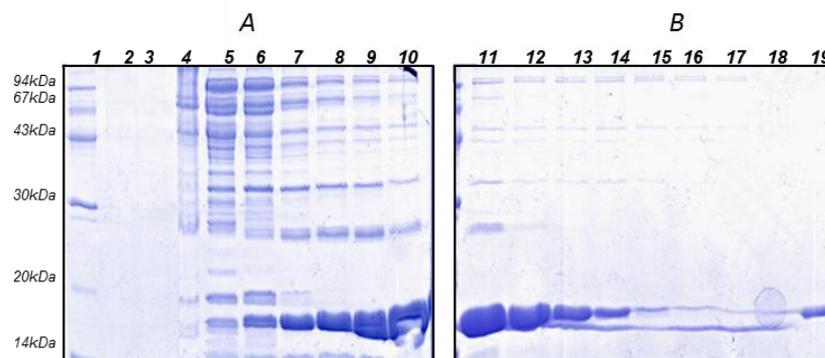
Medio de cultivo YT 2x: bactotripton 1.6% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v), NaCl 0.5% (p/v).

El medio se esteriliza en autoclave y se le añade ampicilina a una concentración final de 20 µg/mL.

Tampón I equilibrado: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, pH 7.4.

Tampones de elución II y III: tampón I con 100 mM (II) y 500 mM (III) de imidazol, respectivamente.

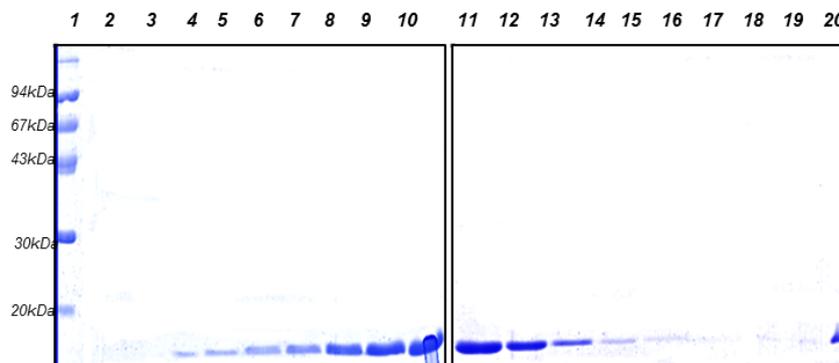
El precipitado bacteriano se descongeló y se resuspendió en 0.5 mL de tampón I por mL de cultivo. Las bacterias se depositaron en un baño de hielo y se rompieron mediante 3 pulsos de ultrasonido de intensidad media durante 30 segundos cada uno, y separados por intervalos de 1 minuto en un equipo de desintegración ultrasónica Soniprep 150 plus de la marca MSE. A continuación el lisado se incubó con Tritón X-100 1% (v/v) durante 30 minutos a 4° C. Después se centrifugó a 12000 g durante 10 min y a la misma temperatura, separándose así la fracción soluble de los restos celulares insolubles. El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.2 µm de tamaño de poro (Sartorius). La cromatografía en columna Ni-Chelating Sepharose Fast Flow™ (Pharmacia) de 0,5 x 2,5 cm, se efectuó siguiendo un protocolo previamente descrito (Aledo *et al.*, 2001). Las fracciones presentaron un moderado grado de contaminación con otras proteínas (Figura 5).



**Figura (5).** Análisis SDS-PAGE de las fracciones de GIP obtenidas después de la purificación por cromatografía de afinidad níquel-Sepharosa. Las alícuotas analizadas contenían cerca de 10 a 20 µg de proteína. Calle 1: marcador de masa molecular; calles 6-20: fracciones de 0.5 mL colectadas de la columna de afinidad durante la elución con un gradiente lineal de imidazol entre 100 y 500 mM.

Aquellas fracciones con menor grado de contaminación fueron dializadas frente al tampón deseado y utilizadas para la purificación de los antisueros anti-GIP y anti-KGA, respectivamente (véase Metodología experimental apartado 3.4.10).

Una segunda purificación por cromatografía de intercambio catiónico, empleando una columna de carboxi-metil (CM)-Sefarosa™ fue necesaria para obtener proteína GIP con el grado de pureza que exigen los experimentos de búsqueda de interactores (Aledo *et al.*, 2001). La pureza de GIP obtenida después de esta segunda cromatografía se comprobó mediante SDS-PAGE (Figura 6).



**Figura (6).** Análisis SDS-PAGE de las fracciones de GIP obtenidas tras la segunda purificación por intercambio catiónico CM-Sefarosa™. Calle 1: marcador de masa molecular; calles 4-19: fracciones correspondientes a la elución en gradiente lineal de NaCl. Calle 20, GIP recombinante humana.

### 3.4.10 Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

Algunos anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad frente al antígeno de interés. Para ello se utilizó agarosa activada por bromuro de cianógeno (Amersham Pharmacia Biotech), tal y como se describe a continuación.

#### 3.4.10.1 Preparación de la columna

Se preparó una columna de 1 mL con el antígeno unido covalentemente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre 5 y 10 mg de ligando se disolvieron en 1.5 mL de tampón de acoplamiento (ver Apéndice), y después de medir la absorbancia de la disolución a 280 nm, se mezcló con 300 mg de la resina comercial, que había sido previamente tratada con HCl 1mM. La mezcla se

incubó una hora a temperatura ambiente. Para controlar la eficiencia del proceso de unión del ligando a la resina, una vez acabada la incubación se centrifugó a baja velocidad la disolución para precipitar la resina y se midió la  $A_{280}$  del sobrenadante. Generalmente se acopló a la resina >90% del ligando depositado inicialmente. A continuación, se lavó el gel con 5 mL de tampón de acoplamiento, para retirar el exceso de ligando que no se había unido a la agarosa. Los grupos activos sobrantes se bloquearon mediante una incubación de 2 h a temperatura ambiente con una disolución de glicina 100 mM pH 8. Después, el gel se lavó con al menos tres ciclos de pH alternativo. Cada ciclo consistió de un lavado con tampón acetato pH 4, seguido de otro lavado con tampón Tris pH 8 (ver Apéndice). La columna se equilibró después con tampón PBS.

#### **3.4.10.2 Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$**

El sulfato de amonio se utiliza como floculante y como reactivo para purificar proteínas, debido a que permite efectuar una precipitación fraccionada de las mismas a medida que aumentamos la fuerza iónica del medio con esta sal. Se añadió a 4 mL de suero inmune de interés 0.1 volumen de un tampón que contenía Tris-HCl 1M, pH 8. Se pesó la cantidad necesaria de  $(NH_4)_2SO_4$  para alcanzar el 50% de saturación (29.5 g/100 mL), se añadió el sólido lentamente al volumen del suero diluido en intervalos de tiempo que oscilaron entre 10 y 15 minutos manteniendo una agitación permanente y lenta durante una hora en cámara fría (4°C). Después, se centrifugó a 10000 g 20 minutos y se resuspendió el precipitado del paso anterior con 4 volúmenes de solución saturada de  $(NH_4)_2SO_4$  al 50% dejándose agitar lentamente 30 minutos 4°C. Finalmente, se centrifugó a 10000 x g 20 minutos, se resuspendió el precipitado en 0.5 volúmenes de Tris HCl 10 mM, pH 7.5 y se dializó toda la noche y medio día frente a este tampón.

Se tomaron 2 mL del suero clarificado y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos para eliminar cualquier material insoluble que pudiera estar presente. Se cargó en la columna la muestra diluida 10 veces con Tris-HCl 10 mM

pH 7.5 y el eluido se pasó por la resina dos veces más. A continuación, se lavó con 20 mL de Tris-HCl pH 7.5 y con 20 mL del mismo tampón conteniendo 0.5 M de NaCl. La fracción de IgG ácido-sensible se eluyó utilizando 10 mL de glicina 100 mM pH 2.5, y se recogió en un tubo conteniendo 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8. La columna se lavó con Tris-HCl 10 mM pH 8.8 hasta que el eluido presentó dicho pH. A continuación, se eluyó la fracción de IgG base-sensible con 10 mL de trietilamina 100 mM pH 11.5, sobre un tubo que contenía también 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8. La columna se lavó entonces con Tris-HCl pH 7.5.

Las dos fracciones eluidas se unieron y se sometieron a diálisis frente a PBS con azida sódica 0.02% (p/v) durante 24h (un cambio de tampón PBS/azida sódica a las 12 h). La disolución resultante fue concentrada aproximadamente seis veces utilizando filtros Centricon YM-30 (Amicon). Las alícuotas se almacenan a -80°C. En el caso de los anticuerpos anti-GAB, se añadió BSA a una concentración del 0.1% (p/v).

En la siguiente tabla se encuentran los anticuerpos que fueron purificados por afinidad durante la realización de este trabajo, y el ligando que se utilizó para ello:

Nombre del antisuero	Ligando	Nombre del anticuerpo purificado
Anti-GST-GIP	His-GIP	Anti GST-GIP
Anti-GAB	GAB	Anti-GAB
Anti-GIP	6x-His-GIP	Anti-GIP
Anti-KGA	His-KGA	Anti-KGA

### **3.4.11 Obtención de extractos solubles de proteínas nucleares de cerebro de rata**

#### **3.4.11.1 Aislamiento de núcleos a partir de cerebro de rata**

La manipulación de los animales y las técnicas experimentales utilizadas respetaron la legislación actual en materia de ética en experimentación animal y bioseguridad (normativas establecidas en las recomendaciones del ICLAS y de la directiva 86/609/CEE recogidas en el Real Decreto 23/1988 del 14 de Marzo), así como la Declaración de Helsinki. Se trató de mitigar al máximo el dolor, sufrimiento o estrés del animal, así como reducir al mínimo el número de animales en cada diseño experimental.

Tras sacrificar al animal, se extrajo el cerebro mediante técnica quirúrgica rápidamente, se lavó en tampón PBS y se congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, almacenándose posteriormente a -80°C. Para el aislamiento de núcleos, se descongelaron y se homogeneizaron 2 g de cerebro de rata en 4 volúmenes de tampón (Tris-HCl 5 mM, pH 7.5, sacarosa 0.25 M, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, EDTA 1mM y EGTA 0.5 mM) con un homogenizador Potter manual de teflón/vidrio. Básicamente se siguió el protocolo descrito previamente por Tanigawa et al. (1978) con mínimas variaciones descritas previamente (Olalla *et al.*, 2002).

#### **3.4.11.2 Preparación de extractos nucleares solubles**

Los núcleos aislados de cerebro de rata a una concentración de proteínas total de 0.9 mg/mL fueron finalmente resuspendidos en un medio Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM y glicerol 30% (v/v). A continuación, se centrifugaron las muestras a 100000 g durante 1h. El precipitado del paso anterior se resuspendió en tampón de lisis: Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 0.35 M, EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM y sacarosa 250 mM, conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y TX-100 1% (v/v), añadiendo un volumen tal que la concentración de proteínas quedó aproximadamente a 1 mg/mL. Se incubó la muestra 1h a 4°C con agitación, procurando usar siempre el mismo

tubo con el que centrifugamos. Finalmente, la muestra se centrifugó a 100000 g durante 1h. El sobrenadante del paso anterior (disolución conteniendo proteínas nucleares) se ajustó al volumen inicial y se separaron pequeñas alícuotas de 50  $\mu$ L para análisis de proteínas y electroforesis SDS-PAGE.

#### **3.4.11.3 Determinación cuantitativa de proteínas**

Para la medida de proteínas en fracciones crudas se usó el método descrito por Markwell et al. (1981), especialmente indicado para homogenizados de tejidos, fracciones de membrana y lipoproteínas. La principal modificación consiste en la adición de SDS al reactivo alcalino, lo que permite ensayar las muestras sin previa solubilización o separación de lípidos. Se preparó una recta patrón de 20 a 100  $\mu$ g/mL de albúmina de suero bovino (BSA) y se midió el incremento de absorbancia a 660 nm.

Para una determinación rápida de proteínas se usó así mismo el método de Bradford (1976), basado en la unión del colorante azul brillante de Coomassie a las proteínas. Para la recta patrón, se prepararon varios puntos de BSA, de 1 a 20  $\mu$ g/mL. El incremento de absorbancia se midió a 595 nm.

#### **3.4.11.4 Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE**

Procedimiento:

Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturizante (en presencia de SDS) en geles pequeños de poliacrilamida, de 0.75 mm de grosor, según el método de Laemmli (1970).

Las muestras se mezclaron con tampón de carga de electroforesis y se hirvieron durante 5 minutos. Los marcadores de masa molecular empleados fueron: fosforilasa b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14 kDa) (Amersham-Pharmacia Biotech). En algunos casos se usaron patrones de masa molecular preteñidos: MBP- $\beta$ -galactosidasa (175 kDa), MBP-paramiosina (83

kDa), GDH (62 kDa), aldolasa (47.5 kDa), triosafosfato isomerasa (32 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina A (25 kDa), lisozima (16.5 kDa) y aprotinina (6.5 kDa) (Sigma).

La electroforesis se inició a 20 mA/placa en el gel concentrador y se continuó a 30 mA/placa en el gel separador. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. El gel se bañó en solución teñidora durante 15 minutos y a continuación se destiñó con varios cambios de solución desteñidora.

#### **3.4.11.5 Inmunotransferencias Western**

Procedimiento:

Las electroforesis para inmunotransferencias Western se realizaron como se describe en el apartado anterior. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora, empleando el sistema de transferencia Electro Blot Maxi 20 x 20cm, Cleaver. Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo Ponceau durante 30 segundos y después se destiñó con varios lavados con agua destilada. Esto nos permitió comprobar la validez de la transferencia y cortar correctamente las calles destinadas al revelado con anticuerpos.

La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo y después se lavó 2 veces con tampón TPBS, durante 10 minutos. A continuación, la membrana se incubó con tres anticuerpos primarios por separado: a) policlonal de conejo *Nuclear Loading Control*, anticuerpo frente a la proteína de unión a la caja TATA o *TATA-binding protein* (TBP) (1TBP18-Abcam), dilución 1/1000 en TPBS-BSA 5% (p/v) e incubación durante una noche a 4°C; b) anticuerpo monoclonal de ratón *Mitochondrial Loading Control*, anticuerpo frente a la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (COXIV-Abcam), dilución 1/1000 en TPBS-BSA 5% (p/v) e incubación durante una noche a 4°C y; c) policlonal de conejo anti-GAB dilución 1/1000 en TPBS-BSA 5% (p/v) e incubación de 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación para cada anticuerpo, la membrana se lavó 3 veces con tampón TPBS durante 10

minutos. La membrana se incubó entonces en una dilución 1/80000 de los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a peroxidasa (anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón), en tampón TPBS y durante 1 h a temperatura ambiente para cada uno de ellos. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con tampón TPBS.

El revelado se realizó con el sistema quimioluminiscente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce). A continuación, se retiró el exceso de reactivo y se procedió a la detección de la fluorescencia emitida con películas de autorradiografía de alta sensibilidad (Kodak Omat).

### ***3.4.12 Aislamiento de proteínas asociadas a GIP en fracciones nucleares de cerebro de rata mediante cromatografía de afinidad***

#### ***3.4.12.1 Preparación de una columna de afinidad GIP-Sefarosa***

La proteína GIP purificada se dializó frente a tampón de acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 200 mM pH 8.3, NaCl 500 mM) y, posteriormente, 10 mg de proteína se unieron covalentemente a una columna analítica (1 mL de volumen de lecho) de Sefarosa-6MB activada con bromuro de cianógeno (Amersham-Pharmacia Biotech), según las recomendaciones del fabricante.

#### ***3.4.12.2 Preparación de una columna de afinidad BSA-Sefarosa utilizada como columna control***

Se unieron covalentemente 6 mg de albúmina de suero bovino (BSA), fracción V, libre de ácidos grasos (Roche) tal y como se describe en el apartado anterior.

#### ***3.4.12.3 Clarificación del extracto nuclear soluble de cerebro de rata***

Se equilibró la columna BSA-Sefarosa con 4 volúmenes de tampón de acoplamiento (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.35 M, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM). El extracto nuclear soluble se pasó 3 veces (recirculación) por la columna control BSA-Sefarosa por gravedad, la fracción no retenida (eluida) por esta

columna fue purificada por cromatografía de afinidad en una columna GIP-Sefarosa.

#### **3.4.12.4 Purificación por afinidad del extracto nuclear soluble de cerebro de rata**

El extracto nuclear clarificado (una vez eliminadas las proteínas que se unen de forma inespecífica mediante la columna control BSA-Sefarosa) se mezcló con 1 mL de resina GIP-Sefarosa previamente equilibrada con tampón de acoplamiento (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.35 M, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM), procurando una proporción de 2-3 volúmenes de extracto nuclear soluble por volumen de gel. Se incubó la mezcla una noche a 4° C en un agitador orbital. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se dejó sedimentar el gel y se extrajo de la parte superior la mayoría del sobrenadante, excepto un volumen igual a 2 volúmenes de gel para permitir formar una buena suspensión por agitación. Entonces, esa suspensión se empaquetó sobre una columna de 5 mL (Econocolumn, BioRad) recuperando el líquido que eluyó por la parte inferior de la columna para ser analizado por SDS-PAGE y Bradford (fracción de proteínas no adsorbidas o no retenidas por la columna (flow-through)). La columna se lavó con 10 mL de tampón de acoplamiento y se recogieron fracciones de 1 mL (fracción lavado), siendo el flujo empleado el obtenido por gravedad. Finalmente, las proteínas se eluyeron con 10 mL de tampón de elución (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 1 M, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM), recogándose fracciones de 1 mL. Las fracciones fueron posteriormente desaladas para su análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción de plata compatible con EM.

#### **3.4.13 Tinción de geles con Ag compatible con EM**

Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas son detectadas por el método de tinción de plata compatible con EM. En esta tinción, las proteínas son detectadas por la reducción diferencial de iones de plata que se unen a las cadenas laterales de sus aminoácidos. Básicamente existen dos métodos para teñir con plata, los que utilizan soluciones de plata amoniacales y

los que usan nitrato de plata. Ambos métodos son muy sensibles ya que pueden detectar de 0.1-10 ng de proteína por banda. Para realizar esta tinción es muy importante que los reactivos y el agua utilizados sean de alta calidad, y es necesaria la utilización de guantes para manipular el gel ya que las huellas de las manos comúnmente son detectadas mediante esta tinción. Para poder procesar posteriormente las muestras por EM, se elimina de esta receta la fijación con formaldehído.

Procedimiento:

Inmediatamente después de la separación proteica de las muestras mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE, los geles fueron incubados durante 30 minutos con la solución de fijación. Transcurrido este tiempo, se incubaron con el tampón de sensibilización 30 minutos, seguido de tres lavados consecutivos durante 5 minutos cada uno con agua Milli-Q. Se procedió a la tinción con nitrato de plata durante 20 minutos. Después se lavaron los geles dos veces con agua a intervalos de tiempo de un minuto cada uno. Posterior a este paso, se reveló con el tampón de revelado durante 5 minutos y, finalmente, se neutralizó la reacción con la solución de parada seguido de tres lavados consecutivos durante 5 minutos cada uno. Las bandas recortadas del gel, se analizaron por espectrometría de masas.

### **3.4.14 Espectrometría de Masas**

#### **3.4.14.1 Lavado y desteñido de las bandas**

Las bandas finamente cortadas se incubaron 20 minutos con 200  $\mu$ L de una mezcla 1:1 (v/v) de  $K_3Fe(CN)_6$  30 mM y tiosulfato sódico 100 mM. A continuación, se retiró la solución y se incubaron las muestras de forma secuencial con 200  $\mu$ L de agua durante 15 minutos y 100  $\mu$ L de bicarbonato amónico 25 mM por otros 20 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ L de bicarbonato amónico 25 mM/50 % acetonitrilo durante 20 minutos y por duplicado.

#### **3.4.14.2 Digestión con tripsina**

Se preparó una disolución de tripsina, diluyendo la solución stock (0.1 µg/µL tripsina en ácido acético (AcH) 50 mM) con bicarbonato amónico 50 mM, en la proporción 10 µL de stock de tripsina por 90 µL de bicarbonato. Se añadieron 30 µL de solución de tripsina en bicarbonato amónico 50 mM y se aumentó el volumen para rehidratar bien todos los trozos de acrilamida evitando el exceso de volumen. Las muestras se incubaron a 37° C toda la noche.

#### **3.4.14.3 Extracción de los péptidos trípticos**

Después de la incubación toda la noche a 37° C, las muestras se centrifugaron 10 segundos a 8000 g para concentrar el líquido parcialmente evaporado, se retiró el sobrenadante y se añadieron a los tacos de gel 30 µL de una mezcla que contenía 100% acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico, manteniéndose 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se mezcló con el volumen extraído del paso anterior. La solución de péptidos se congeló a -20°C hasta su análisis por EM.

#### **3.4.14.4 Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

La identificación por espectrometría de masas se realizó en la unidad de proteómica de los Servicios Centrales de Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga, en un espectrómetro de masas HCT Ultra (Bruker) de trampa de iones con ionización por *electrospray* (ESI), acoplado en línea a un sistema de nanoHPLC (Agilent), ideal para el análisis de péptidos y proteínas complejas. La identificación de proteínas por huella peptídica tríptica se realizó por análisis de los espectros de masas MS y MS/MS en el motor de búsqueda Mascot, empleando bases de datos MSDB y SPROT.

#### **3.4.14.5 String 9.0: búsqueda de relación proteína- proteína**

El servidor de String 9.0 “Functional protein association networks”, es una base de datos de interacciones descritas y predichas entre proteínas, deducidas de información genómica, de interacción in vitro y de información general recogida en las bases de datos biológicas, donde las interacciones pueden ser de tipo directo (físico) o indirecto (funcional). Este servidor se usó para establecer las relaciones entre las proteínas identificadas por espectrometría de masas, en las bases de datos utilizadas (MSDB y SPROT). Simplemente se elige la proteína y la especie en la que se desea explorar, y el programa genera gráficas de nodos interconectando las proteínas relacionadas, donde la distancia entre los nodos es un indicativo de la asociación.

#### **3.4.15 Experimentos de inmunoprecipitación**

Se seleccionaron un total de 6 proteínas como posibles proteínas que interactúan con la proteína GIP, en función de su puntuación en MASCOT, cobertura de secuencia y a los resultados arrojados por String 9.0. En las reacciones de inmunoprecipitación (IP) se usó el sistema comercial  $\mu$ MACS *Protein G MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema está basado en las interacciones de alta afinidad que se producen entre la proteína G, acoplada a microbolas paramagnéticas y la región Fc del anticuerpo, quedando libre la región Fab que interacciona con el antígeno. Se forma así un sistema multimérico entre el antígeno, el anticuerpo y el complejo proteína G-microbola, que es purificado al quedar retenido en una columna colocada en un soporte magnético.

Procedimiento:

Se mezclaron 250  $\mu$ g de extracto de proteínas nucleares solubles de cerebro de rata con 1-4  $\mu$ g de anticuerpo primario y 50-100 $\mu$ L de proteína G Microbeads (1-4  $\mu$ g de IgG irrelevante fue utilizada siempre en paralelo como control de unión inespecífica por reacción) (ver tabla pág. 53). La mezcla se

incubó 30 minutos en hielo. La columna, introducida en el soporte magnético, fue equilibrada con 200  $\mu\text{L}$  de tampón de acoplamiento (Tris/HCl 20 mM pH 8, NaCl 0.35 M, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM). El extracto proteico se aplicó a la columna magnética y, a continuación, se realizaron 4 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de tampón de acoplamiento seguido de un lavado con 100  $\mu\text{L}$  de Tris HCl 20 mM pH 8 para la remoción de sales residuales y detergentes. Se realizaron dos eluciones consecutivas de 20 y 50  $\mu\text{L}$  con tampón de carga para electroforesis SDS-PAGE calentado previamente a 95°C (ver Apéndice). Tanto las eluciones como los lavados fueron analizados por SDS-PAGE e inmunotransferencias Western. La puesta a punto del protocolo de inmunoprecipitación, usando anticuerpos específicos de proteínas que interaccionan con GIP, se trasladó al sistema que se detalla a continuación, debido a que en la práctica, las cantidades de extracto nuclear proteico, así como de anticuerpos son reducidas.

#### **3.4.15.1 Inmunocaptura de proteínas en ProteinChip arrays PS20**

El microchip de proteínas PS20 *array*, está preactivado con grupos químicos epóxidos que reaccionan con grupos aminos en la superficie de las biomoléculas formando enlaces covalentes. Las moléculas inmovilizadas capturan complejos biológicos mediante uniones específicas no covalentes de una mezcla o extracto proteico. Cada chip posee 8 áreas de depósito (*spots*).

Se acopló 1  $\mu\text{g}$  de proteína G por cada depósito (*spot*) en  $\text{NaHCO}_3$  50 mM pH 9.2, durante 2 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, se eliminó la proteína G y se lavó cada depósito con 5  $\mu\text{l}$  de tampón PBS conteniendo NaCl 150 mM, durante 2 minutos con agitación. Se retiró el PBS y se añadieron 5  $\mu\text{l}$ /depósito de BSA 100  $\mu\text{M}$  en PBS durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear los sitios activos. Después de retirar la BSA, se introdujo el *Protein Chip Array* dentro de un tubo Falcon de 15 mL y se lavó con tampón PBS + 0.5% TX-100, dos veces y empleando 10 minutos en cada lavado. Posteriormente, se realizaron dos lavados adicionales con PBS y agitación fuerte. A continuación, se incubó 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo, diluido en PBS 150 mM, durante 2h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Pasado el tiempo de

incubación, se lavó con 5 µl de PBS/depósito por 2 minutos con agitación fuerte. El lavado se repitió dos veces y se procedió a incubar cada depósito con 3 µg de extracto nuclear de cerebro de rata durante toda la noche y a 4°C. Posterior a esta incubación, se retiró la mezcla proteica y se lavó con PBS 150 mM, 10 minutos tres veces, seguido de un lavado rápido y sin agitación con H<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de sales. Finalmente, se dejó secar el *array* PS20 con el contenido proteico, 5 minutos a temperatura ambiente, y se incubó con 1 µl de una solución saturada al 50% de ácido sinapínico (SPA) por cada depósito. Se dejó secar y se repitió este paso nuevamente.

Se incluyó IgG no relevante de conejo y de ratón para la validación y posterior interpretación del ruido de fondo espectral como control de especificidad.

Se adquirieron anticuerpos específicos frente a las proteínas identificadas como putativos positivos que interactúan con GIP, tal y como se detalla a continuación.

Anticuerpos	µg (anticuerpo)/ µg (extracto nuclear)/ Volúmen PG	µg (PG)/ µg (anticuerpo)/ µg (extracto nuclear)
	(IP con µMACS Protein G MicroBeads).	ProteinChip arrays PS20
Histona H1		1/1/3
Bassoon (Protein Bassoon)	3 µg /250 µg/100 µL	1/1/3
Beta COP (Coat protein Beta Chain)		1/1/3
APC (Adenomatous Polyposis Coli Protein)		1/1/3
BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog)		1/1/3
PLCB4 (1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4)		1/1/3

#### **3.4.15.2 Análisis del complejo de proteínas capturadas en el Array PS20**

Las muestras se analizaron en la unidad de proteómica de la Universidad de Málaga usando un espectrómetro de masas SELDI-TOF, sistema de purificación de proteínas *ProteinChip Seldi System* y el *software Protein Chip Reader* (todo de la casa Bio-Rad).

#### **3.4.16 Actividad GA in vivo**

##### **3.4.16.1 Extracción del tejido**

Los animales fueron sacrificados por decapitación para preservar al máximo la actividad enzimática. El sacrificio se realizó con una guillotina en una campana previamente habilitada para ello. Tras el sacrificio se procedió inmediatamente a la disección del animal para la extracción del cerebro.

##### **3.4.16.2 Congelación en nitrógeno líquido**

El cerebro se depositó en un tubo Falcon de 50 mL y se congeló directamente en nitrógeno. Una vez congelado, el cerebro se almacenó a -80°C hasta su uso.

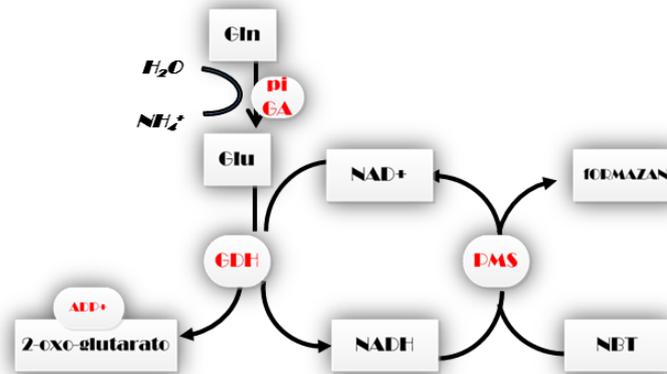
##### **3.4.16.3 Obtención de secciones en criostato para actividad enzimática**

#### **GA**

Se realizaron secciones de cerebro congelado en un criostato (Microm), nuevamente para preservar al máximo la actividad enzimática. Se realizaron cortes de 20 µm. Los cortes de tejido se depositaron en portas pre-tratados con poli-L-lisina para una mayor adherencia. Estos cortes se emplearon en el mismo día para la técnica histoquímica (manteniéndolos a -20°C hasta el momento de la incubación) o bien, se guardaron en un congelador a -20°C para emplearlos otro día. El almacenamiento de los cortes durante largos periodos de tiempo a -20°C supone una pérdida de reactividad, por lo que es aconsejable cortar y realizar las incubaciones el mismo día.

**3.4.16.4 Preparación del medio de incubación para la detección de actividad GA**

La actividad GA se detectó de forma indirecta mediante las siguientes reacciones enzimáticas acopladas:



El Glu generado por la actividad GA es oxidado por la enzima GDH dando como productos 2-oxo-glutarato y NADH. El poder reductor de NADH es transferido a la sal de tetrazolio (Nitro-blue tetrazolium, NBT), reacción facilitada por la fenazina metosulfato (PMS). Al reducirse el NBT se produce un formazán de color azul que precipita. Así, donde haya actividad GA se observará un precipitado de color azul. Esta medida *in situ* de actividad GA fue puesta a punto inicialmente en el análisis de GA por electroforesis nativa (Aledo *et al.*, 1993) y en otros tejidos como páncreas (Montero *et al.*, 2007). El ADP es activador de la GDH y el fosfato (Pi) activador de GA.

Los componentes usados para la detección de la actividad GA se detallan en la siguiente Tabla, así como las concentraciones finales en la mezcla de reacción:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL	ALMACENAMIENTO
Tris-HCl, pH 8	200 mM	1 M, 4° C
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH8	200 mM	1 M, 4° C
NH <sub>4</sub> Cl	5 mM	4°c
EDTA	0.1 mM	0.5 Mm, 4° C
Glutamina	40 mM	Polvo a temperatura ambiente
NAD <sup>+</sup>	3.4 mM	-20° C
ADP (ATP)	0.5 mM (2 mM)	-20° C
Nitro-blue tetrazolium (NTB)	0.3 mM	-20° C
Phenazine metosulphate (PMS)	0.49 M	-20° C
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	50U/ml	-20° C
Alcohol de polivinilo (PVA)	5%	Polvo a temperatura ambiente
Agua bidestilada	-----	

Aunque el pH óptimo de GA es algo mayor que 8, se ajustó el pH del medio a 8 para no comprometer las demás reacciones que tienen lugar. Es indispensable preparar la mezcla de reacción a 4° C y protegido de la luz.

#### **3.4.16.5 Ensayo de actividad enzimática GA en cerebro de rata**

Se probaron diferentes concentraciones de enzima auxiliar GDH: 20, 50, 80 y 100 unidades de enzima, así como diferentes concentraciones de Gln: 40 mM y 80 mM. Los mejores resultados se obtuvieron con 40 mM Gln y 80 unidades de enzima auxiliar GDH. Básicamente, se siguió el protocolo descrito por Montero *et al.* (2007) para la incubación con el medio de reacción histoquímica, hasta la fijación y preparación del tejido para el tratamiento inmunohistoquímico.

#### **3.4.16.6 Post-fijación del tejido**

Este paso permite preservar la estructura del tejido. Se ha post-fijado con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Tras la post-fijación se realizaron lavados de 10 minutos con PBS 0.1 M o agua bidestilada.

#### **3.4.16.7 Montaje de las preparaciones**

Tras la post-fijación se procedió al montaje definitivo de las secciones procesadas. Para ello, se utilizó el medio de montaje DPX. En el caso del marcaje inmunofluorescente posterior a la tinción histoquímica, se utilizó DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), como medio de montaje para preservar la fluorescencia.

#### **3.4.16.8 Controles de la reacción histoquímica de actividad GA**

Para determinar la especificidad de la reacción enzimática en secciones de cerebro de rata, se han empleado dos controles negativos diferentes: uno en el que se omite el fosfato (activador necesario de la actividad GA) y otro en el que se omite Gln (sustrato enzimático).

#### **3.4.16.9 Inmunofluorescencia posterior al tratamiento histoquímico para la detección de actividad GA**

Para identificar si células gliales de tipo astrocitario presentan actividad GA con la técnica histoquímica anteriormente descrita, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena 30 minutos con peróxido de hidrógeno a una dilución 1:10 en PBS, seguido de un bloqueo de Avidina/biotina durante 10 minutos cada uno, separados por un lavado en PBS 10 minutos. A continuación, se realizó un bloqueo con BSA al 5% en PBS conteniendo TX-100 al 0.2% (p/v). La incubación del anticuerpo primario específico de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcadora de astrocitos), producida en pollo, se dejó 1 noche a temperatura ambiente a una dilución 1:2000 en PBS conteniendo TX-100 al 0.2% (p/v) y azida sódica al 0.02% (p/v). El marcaje fluorescente se realizó con un anticuerpo secundario, desarrollado en cabra y utilizado a dilución 1:100. El secundario estaba marcado con Alexa Flúor que se excita a 488 nm (verde) y disuelto en PBS con TX-100 al 0.2% (p/v) durante 1 h. Tras la incubación del anticuerpo secundario, se lavaron los cortes 3 veces con PBS 10 minutos por cada lavado y finalmente, se procedió al montaje de las muestras en DABCO.

#### **3.4.17 Inmunocitoquímica en líneas tumorales humanas**

##### **3.4.17.1 Medios de cultivo para células eucariotas**

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0.4 mL de medio de cultivo por cada  $\text{cm}^2$  de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (2000a). Las líneas celulares que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Para tal fin, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, es decir cubrieron la totalidad de la superficie de los frascos donde se estaban desarrollando, se procedió a retirar el sobrenadante y a lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco) 0.05% (p/v) y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Gibco) 0.02% (p/v) en PBS durante 15 s a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la acción de

inhibidores de la tripsina presentes en el suero fetal bovino (SFB). Se respetó una relación de 20  $\mu\text{L}$  de solución de tripsina-EDTA por cada  $\text{cm}^2$  de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el desprendimiento completo de las células adheridas. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular.

#### **3.4.17.2 Tratamiento de células SHSY-5Y con éster de forbol PMA**

Para el estudio del efecto de los ésteres de forbol, como el PMA, en células tumorales humanas, se sembraron  $1.3 \times 10^6$  células por placa. Transcurridas 24 horas, las placas se incubaron con PMA durante 6 horas. La concentración final de PMA fue de 1  $\mu\text{M}$  en DMSO. En paralelo, se incubaron células durante el mismo tiempo sólo con DMSO como control negativo. A continuación, se recogieron las células y se procesaron como recomienda el fabricante para el aislamiento de la fracción nuclear y citoplasmática (NE-PER *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Pierce). Se analizaron mediante inmunotransferencia Western.

Para los experimentos de inmunocitoquímica, se sembraron 50.000 células por pocillo con un volumen de medio de 400  $\mu\text{L}$  en portas poli-lisinados adaptados para la realización de varias pruebas en simultáneo (8 wells, Permanox® slide, 0.8  $\text{cm}^2/\text{well}$ , sterile, 96/cs, NUNC).

Las células se lavaron con PBS y se fijaron añadiendo 1 volumen de formaldehído al 4% (v/v) en PBS a temperatura ambiente 10 minutos. Después se incubaron con 1 volumen de PBS TX-100 0.1% 12 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Los porta-objetos con las células fijadas se incubaron con una solución de bloqueo que contenía PBS, 1% BSA y 0.2% (p/v) de TX-100, durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se les añadió la solución de anticuerpos primarios anti-GAB y se incubaron toda la noche a 4° C en PBS, 0.2% (p/v) TX-100. Se lavaron los pocillos 3 veces con PBS

y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo primario toda la noche a 4° C. A continuación, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos excitables a 488 nm (verde) y 568 nm (rojo), según la preferencia deseada. Finalmente, las muestras se montaron en DABCO.

Para dobles marcajes fluorescentes se incubó en primer lugar con anticuerpos anti-GAB.

Para los ensayos inmunocitoquímicos realizados en células transfectadas se siguió exactamente el protocolo anterior, manteniendo la preferencia en el orden de incubación de anticuerpos anti-GAB. Las imágenes de la proteína recombinante EGFP-GAB se tomaron con un microscopio de fluorescencia.

Anticuerpos primarios	Características	Dilución
Anti-GAB	Anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad	1:2000
Anti-GAB	Anticuerpo policlonal de rata purificado por afinidad	1:2000
Anti-JMJD5(C-terminus)	Policlonal de conejo (Millipore)	1:200
Anti-SC35 (phospho) antibody [SC-35]	Monoclonal de ratón, Nuclear Speckle Marker (ABCAM)	1:300
Anti-Fibrillarin antibody [38F3]	Monoclonal de ratón (ABCAM)	1:300
c-Myc Monoclonal Antibody	Monoclonal de ratón CLONTECH	1:200
Anticuerpos secundarios	Características	Dilución
Alexa fluor 468 (invitrogen)	Estreptavidina conjugada, SIGMA	1:1000
Alexa fluor 568 (invitrogen)	Estreptavidina conjugada (SIGMA)	1:1000
Alexa fluor 568 (invitrogen)	Cabra anti-conejo (SIGMA)	1:500
Alexa fluor 568 (invitrogen)	Cabra anti-ratón (SIGMA)	1:200
Alexa fluor 488 (invitrogen)	Cabra anti-conejo (SIGMA)	1:500

### **3.4.18 Inmunohistoquímica**

#### **3.4.18.1 Fijación de los cerebros**

La fijación de los cerebros se realizó mediante perfusión vascular con una solución fijadora, seguida de una post-fijación por inmersión.

Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y tras la pérdida total de reflejos se procedió a la apertura de la caja torácica para exponer el corazón. A través de una cánula insertada en el ventrículo izquierdo, y tras practicar una incisión en la aurícula derecha, se hizo pasar en primer lugar tampón PBS durante 5-10 minutos, seguido de una solución fijadora. Para los estudios inmunocitoquímicos a microscopía óptica se utilizó el fijador PLP (4% paraformaldehído/ 75 mM lisina/ 10 mM metaperiodato sódico en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4, ver Apéndice). Para los estudios inmunocitoquímicos a microscopía electrónica se utilizó paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en tampón PBS. Los cerebros se extrajeron y se postfijaron por inmersión en la misma solución fijadora utilizada en la perfusión durante toda la noche a 4° C.

#### **3.4.18.2 Crioprotección y congelación**

Los cerebros que se utilizaron para inmunocitoquímica a microscopía óptica se crioprotegieron para preservar la estructura del tejido durante la congelación. Para ello, después de la post-fijación, se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS, y se mantuvieron a 4°C con agitación suave hasta su total hundimiento. Una vez crioprotegido, el material se congeló rápidamente con nieve carbónica (-75°C) y se almacenó a -80°C hasta la obtención de las secciones.

#### **3.4.18.3 Obtención de las secciones**

Los estudios inmunohistoquímicos a microscopía óptica convencional y microscopía confocal se llevaron a cabo empleando secciones de 30 µm de

grosor que se obtuvieron en un microtomo de congelación (Leica, modelo CM 1325). Los cortes se almacenaron a 4°C en tampón PBS con 0.02% de azida sódica hasta su posterior procesado.

### 3.4.19 Inmunotinción

#### *Anticuerpos primarios utilizados*

	Características	Dilución
Anti-GAB	Anticuerpo policlonal de conejo.	1:10000
Anti-KGA	Anticuerpo policlonal de conejo, purificado por afinidad.	1:1000
Anti-GIP	Anticuerpo policlonal de conejo, purificado por afinidad.	1:500
Anti-GFAP	Anticuerpo monoclonal de ratón (Boehringer)	5 µg/mL

Antes de la inactivación de la peroxidasa y de avidina/biotina endógenas, y con el fin de intensificar la señal histoquímica, se incubaron las muestras primero en tampón citrato (50 mM pH 6) a 80°C durante 30 minutos.

#### *3.4.19.1 Inmunohistoquímica para microscopía óptica*

Las secciones flotantes de cerebro de rata se procesaron utilizando dos técnicas inmunocitoquímicas: la avidina-biotina y la peroxidasa anti-peroxidasa. En ambas técnicas, se pone de manifiesto la existencia del anticuerpo primario mediante la actividad de una enzima peroxidasa. Es por tanto necesario eliminar la actividad peroxidasa endógena de los tejidos antes de su procesado inmunocitoquímico. Para ello se realizó una incubación de los cortes en una disolución del 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10% de metanol en tampón PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las secciones durante 1 hora con tampón PBS. Las secciones fueron posteriormente tratadas de manera diferente según la técnica empleada.

### **3.4.19.2 Técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina**

Debido a la naturaleza de esta técnica, fue necesario bloquear previamente la biotina y avidina endógenas, además de las proteínas que se unen a biotina. Para ello se utilizó el kit de bloqueo de Vector Labs, y se siguieron las instrucciones del fabricante. A continuación las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (anti-KGA 48h o anti-GAB 48h) a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con tampón PBS de 10 minutos cada uno. Después se procedió a la incubación en un anticuerpo secundario biotinilado, que fue diferente según el organismo en el que se había desarrollado el anticuerpo primario. En el caso de anticuerpos primarios de conejo se utilizó un anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Vector Labs), diluido 500 veces en tampón PBS con 0.3% de TX-100 (p/v) y 0.1% de azida sódica. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, las secciones se lavaron durante 30 minutos en tampón PBS, realizando tres cambios del mismo. Por último, los cortes se incubaron en extravidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (Sigma) diluida 2000 veces en tampón PBS con 0.3% de TX-100 (p/v), durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron tres lavados en tampón PBS de 10 minutos cada uno. El revelado de la actividad peroxidasa se llevó a cabo incubando las secciones en una disolución del 0.05% (p/v) de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) y 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v). En la mayoría de las ocasiones, se añadió a la disolución un 0.05% de sulfato amónico de níquel (p/v) para intensificar la marca obtenida. Finalmente, las secciones se lavaron en PBS y se montaron sobre portaobjetos gelatinados (ver Apéndice) dejándose secar al aire. Posteriormente se deshidrataron en una graduación creciente de alcoholes (50°, 70°, 96°, 100°), se aclararon con xileno y se montaron con el medio de montaje DPX.

### **3.4.20 Inmunofluorescencia en cerebro de rata**

Los cortes se incubaron primero en tampón citrato (50 mM pH 6) a 80°C, durante 30 minutos. Posterior al bloqueo de peroxidasa, avidina y biotina endógenas (en el caso de utilizar anticuerpos biotinilados acoplados a extravidina fluorescente), las secciones se incubaron con uno de los anticuerpos primarios anti-GAB o anti KGA, 48 h a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con tampón PBS durante 10 minutos, los cortes se incubaron con el segundo anticuerpo primario GFAP, durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios de manera secuencial. Se utilizaron diluciones 1:500 en tampón PBS con el 0.2% de TX-100 (v/v) de anticuerpos secundarios acoplados a diferentes fluorocromos de la familia de las Alexas<sup>TM</sup> (Molecular Probes) y una dilución 1:1000 de extravidina fluorescente cuando se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado. En concreto, se utilizó un anti-IgG de conejo desarrollado en cabra unido a una Alexa<sup>TM</sup> excitable a 568 nm (rojo) y un anti-IgG de ratón y/o pollo desarrollado en cabra unido a una Alexa<sup>TM</sup> excitable a 488 nm (verde). La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 90 minutos a temperatura ambiente y protegiendo de la luz.

#### **3.4.20.1 Inmunofluorescencia en tejido humano**

Las muestras de cerebro humano (corteza temporal) proceden de la autopsia de individuos varones con edades comprendidas entre 54 y 58 años sin ninguna enfermedad neurológica o psiquiátrica conocida. Estas muestras fueron suministradas por el Biobanco del Instituto de Neuropatología IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona, España), con la aprobación de la Dra. Antonia Gutiérrez, del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Málaga, en cuyo laboratorio se han realizado los experimentos. Después de la extracción del cerebro, el tejido fue inmediatamente fijado en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB: 0.1M y pH 7.4), 2 h. A continuación, el tejido se cortó en pequeños bloques que se postfijaron durante 24-48 h a 4°C, con agitación. Después de la agitación las muestras se sumergieron en soluciones de

sacarosa crecientes y se almacenaron a -20°C en solución crioprotectora. El tejido cortical, se cortó en secciones de 30 µm de grosor con ayuda de un micrótopo de congelación y se almacenaron en *free floating* de manera seriada en placas multipocillo. Las secciones de cada región se procesaron en paralelo para los estudios inmunohistoquímicos.

Para el marcaje fluorescente y con el fin de intensificar la señal histoquímica, se incubaron las muestras primero en tampón citrato (50mM pH 6) a 80°C, durante 30 minutos. A continuación, se incubaron secuencialmente los anticuerpos primarios correspondientes (conejo anti-KGA 1:1000; Pollo anti-GFAP 1:2000) diluidos en tampón PBS con azida sódica al 0,1% y TX-100 al 0,2% (p/v), a temperatura ambiente y durante 48 y 24 h, respectivamente. La unión del anticuerpo primario a su antígeno fue detectada incubando las secciones con anticuerpos secundarios correspondientes a Alexa 568/488 (acoplados directamente a un fluorocromo diluido 1:1000), ambos diluidos en tampón PBS, TX-100 al 0.2% (p/v), durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Para eliminar la auto fluorescencia del tejido debido a la acumulación con la edad de gránulos de lipofucsina autofluorescentes, se sumergieron los cortes previamente montados sobre portaobjetos gelatinados en alcohol al 70% durante 5 minutos y seguidamente, en una solución comercial (*Autofluorescence Eliminator Reagent*, Millipore) siguiendo las especificaciones del fabricante. Por último, se cubrieron las secciones usando un medio de montaje específico para mantener la fluorescencia de las muestras (1:1 PBS 0.1M, glicerina y 3% de diazabicyclo [2.2.2]-octano o DABCO). Las secciones se almacenaron en oscuridad y a 4°C hasta su visualización en un microscopio láser confocal (Leica SP5).

#### **3.4.20.2 Controles de la técnica inmunocitoquímica**

Con el fin de evaluar la especificidad del marcaje inmunocitoquímico en las secciones de cerebro de rata y humano, se realizaron los siguientes controles:

- ⊗ En todos los experimentos se procesaron en paralelo cortes de cerebro omitiendo la incubación en el anticuerpo primario.

- ⊗ Se incubaron secciones con los sueros preinmunes de los conejos en los que se provocó la respuesta inmune para producir los anticuerpos policlonales.
- ⊗ Se procesaron cortes utilizando anticuerpos primarios que habían sido previamente preabsorbidos con su correspondiente antígeno. Para ello se incubó el anticuerpo primario, ya diluido, con una concentración de 150 µg/mL de antígeno durante toda la noche, a 4° C y con agitación suave.

### **3.4.21 Microscopia Electrónica de Transmisión**

Todos los experimentos con animales se han llevado a cabo de acuerdo con el Real Decreto R.D.1201/2005 del 10 de Octubre (BOE 21/10/2005) para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por el “Comité de Uso de Animales para la Investigación” de la Universidad de Málaga. Los experimentos se han realizado en el laboratorio de la Dra. Antonia Gutiérrez.

#### **3.4.21.1 Fijación del tejido y obtención de secciones**

Ratas Sprague-Dawley (machos adultos de 2 meses de edad; aproximadamente 250 g de peso; Charles River Lab., Barcelona) fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico (Dolethal®) a una dosis de 60 mg/kg. A continuación, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con PBS 0.1 M pH 7.4, durante 1 minuto aproximadamente, seguido por una solución fijadora de 4% paraformaldehído/ 0.1% glutaraldehído en tampón PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 20 minutos. A continuación, los cerebros se extrajeron rápidamente y se postfijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en tampón PBS y se almacenaron en esta misma solución tamponadora a 4°C hasta su posterior procesamiento.

Los cerebros fueron cortados en secciones de 50 µm de grosor en el plano coronal con un Vibratomo (Leica, VT1000S), y las secciones se recogieron en PBS 0.1 M con 0.02% de azida sódica.

### 3.4.21.2 Inmunohistoquímica en pre-inclusión

Para aumentar la penetración del anticuerpo, se realizó un proceso de congelación/descongelación de las secciones mediante el que se permeabilizan las membranas celulares pero sin llegar a alterar la morfología de la célula a nivel ultraestructural. Para ello, se procedió de la siguiente forma:

- ⊗ Se incubaron las secciones en solución de crioprotección al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- ⊗ A continuación, se colocaron las secciones en la misma solución crioprotectora durante 20 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- ⊗ Tras dejar atemperar las secciones, se incubaron en una serie de soluciones de crioprotección (diluidas en PBS) a un porcentaje decreciente y a temperatura ambiente.
  - ✓ Solución crioprotección al 100% (10 minutos).
  - ✓ Solución crioprotección al 70% (10 minutos).
  - ✓ Solución crioprotección al 50% (10 minutos).
  - ✓ Solución crioprotección al 30% (10 minutos).

#### Solución de Crioprotección (para 400 mL):

- ✓ 310 mL, Agua desionizada.
- ✓ 800  $\mu\text{l}$ , Azida sódica (10%).
- ✓ 40 mL, Glicerol.
- ✓ 50 mL, PBS (0.4 M)
- ✓ 100 g, sacarosa.

A continuación se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación de las secciones en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 0.1 M, a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, y tras varios lavados en PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-KGA (Olalla *et al.*, 2002) a una dilución 1:250 en la solución de bloqueo (1 mL de azida sódica; 2 g de BSA en 100 mL de PBS 0.1M) durante 2 noches a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Labs, diluido 1/500

en la solución de bloqueo) a temperatura ambiente durante 70 minutos, seguido del complejo avidina-peroxidasa (dilución 1/2000 en PBS) con agitación y temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las secciones fueron incubadas en una solución de DAB (0.05%) en PBS 0.1 M y peróxido de hidrógeno en una concentración final de 0.01% en oscuridad hasta que se observó inmunomarcaje.

### **3.4.21.3 Deshidratación e inclusión en plano**

Se procedió a la post-fijación de las secciones en una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón PBS a 4°C y oscuridad durante 1 hora. A continuación, se procedió a la deshidratación e inclusión en plano de los cortes en resina Araldita de la siguiente forma:

- ✓ Acetona 30%. 30 minutos
- ✓ Acetona 50%. 30 minutos.
- ✓ Acetona 70%. 30 minutos.
- ✓ Acetona 80%. 30 minutos.
- ✓ Acetona 90%. 30 minutos.
- ✓ Acetona 100%. 2 x 30 minutos.
- ✓ Acetona 100% - Resina Araldita (1:1). 1 h.
- ✓ Resina pura (Araldita). 2 h.

Inclusión en plano (láminas entre 2 portaobjetos) en estufa a 60°C durante 24-48 h. Para ello y con sumo cuidado, se colocaron varias secciones entre dos portaobjetos forrados con papel de aluminio y se añadió una pequeña cantidad de resina pura. Se presionaron con cuidado los dos portaobjetos para eliminar las posibles burbujas que se hayan podido formar y todo ello se introdujo en una estufa a 60°C durante 24-48 h para permitir la correcta polimerización de la resina.

#### **3.4.21.4 Montaje y tallado en bloques de resina**

Tras la polimerización, se separaron los cubreobjetos quedando una fina lámina de resina en la que están las secciones incluidas en plano. A continuación, con unas tijeras se cortó una de las secciones de la lámina de resina intentando que quedara intacta toda la zona hipocampal. La porción de tejido cortado se adhirió mediante pegamento comercial de secado rápido a un bloque de resina polimerizada y se dejó secar a temperatura ambiente antes de realizar el tallado del bloque.

Una vez obtenido el bloque de resina con nuestra sección de tejido bien pegada, se montó todo en el soporte del ultramicrotomo para realizar el tallado. Para ello, se utilizó una cuchilla bien afilada y se retiró, poco a poco, distintas porciones tanto de resina como de nuestro tejido. El objetivo final de este procedimiento fue obtener un bloque de resina en el cual tuviésemos una pirámide de base trapezoidal, cuya cara superior sea toda la región de interés para nuestro estudio.

#### **3.4.21.5 Ultramicrotomía**

Las secciones contenidas en las pirámides de los bloques de resina fueron cortadas para obtener cortes semifinos y ultrafinos mediante el uso de un ultramicrotomo (Modelo Ultracut E, Reichert-Jung). Se realizaron en primer lugar cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  de grosor que se tiñeron con el colorante azul de toluidina al 1% para su observación al microscopio óptico. Con ello lo que perseguimos es la determinación del área final de interés que vamos a volver a tallar antes de realizar los cortes ultrafinos.

Las secciones ultrafinas se cortaron con un grosor de 50-60 nm y se recogieron en la balsa de la cuchilla que contenía agua bidesionizada filtrada, pasándose a rejillas de Níquel de 100 agujeros (FF100-Ni, Electron Microscopic Sciences (EMS)).

#### **3.4.21.6 Contrastado de las rejillas**

El contrastado se realizó con compuestos de alto peso atómico: citrato de plomo (Solución de Reynolds) y acetato de uranilo. Ambas sustancias constituyen una barrera al paso del haz de electrones, y dan lugar a una tinción negativa que permite la observación clara de las estructuras celulares.

En una placa de Petri, previamente lavada con agua bidestilada, se introdujo un papel de parafina con la parte limpia hacia arriba, sobre un lecho de hidróxido sódico en lentejas para que absorba el dióxido de carbono del aire, ya que resulta perjudicial para el citrato de plomo, y se tapa sellando con parafilm hasta el momento de su utilización. Se preparó la solución de citrato de plomo y se centrifugó 1 mL en un tubo Eppendorf a 6000 rpm durante 15 minutos, para retirar cualquier impureza. A continuación se inició el contrastado de la siguiente forma: sobre el parafilm se colocó una gota de citrato de plomo y otra de acetato de uranilo por cada rejilla a contrastar. Con unas pinzas se tomó la rejilla procurando no dañar los cortes y se lavó ligeramente en agua bidesionizada libre de CO<sub>2</sub> (mediante ebullición previa; usar a temperatura ambiente). Se colocó la rejilla por la cara donde estaban los cortes sobre la gota de citrato de plomo durante un minuto. A continuación, se lavó la rejilla en tres baños distintos de agua sin CO<sub>2</sub>, para eliminar el exceso de citrato de plomo. Se repitió el procedimiento sobre la gota de acetato de uranilo y los tres lavados en agua bidesionizada. Con papel de filtro, dispuesto en horizontal y al nivel de la rejilla, se absorbió el agua de lavado para secar los cortes. Las rejillas se dejaron secar en pinzas al abrigo del polvo.

#### **3.4.21.7 Observación y procesamiento de imágenes**

La observación de los preparados se realizó en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 del SCAI de la UMA. La obtención de imágenes digitales se realizó con el mismo microscopio electrónico anterior y éstas fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop 7.0.

### **3.4.22 RT-PCR A TIEMPO REAL**

La RT-PCR a tiempo real o RT-PCR cuantitativa es una variación de la RT-PCR estándar utilizada para la cuantificación del RNA mensajero (mRNA) de una muestra. Utilizando cebadores específicos de secuencia, es posible determinar la cantidad relativa y absoluta de un determinado mRNA.

#### **3.4.22.1 Aislamiento de astrocitos de cerebelo de rata**

Los astrocitos puros fueron adquiridos comercialmente a INNOPROT. Aproximadamente  $10^6$  células de cerebelo de rata Sprague Dawley, de día 0 post-natal (Pase 0 y sexo no verificado), sometidas a dieta estándar en pellet e iluminación de ciclo circadiano (12:12 h), se aislaron por separación inmunomagnética en condiciones previamente establecidas (tiempo de incubación para la limpieza de las células no superior a 24 h), omitiendo en los medios de estabilización celular el aminoácido Gln y con una pureza superior al 95%. Posteriormente, fueron congeladas en medio de Cryostor CS10 (10% DMSO).

#### **3.4.22.2 Extracción de RNA total**

El RNA total de astrocitos de cerebelo de rata fue aislado según las especificaciones del fabricante, así como las proteínas utilizadas para el ensayo de inmunotransferencias Western (AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit, QIAGEN). Las células se lavaron brevemente con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos; inmediatamente después, se realizó la homogenización del precipitado celular con 350  $\mu$ L de tampón de lisis- $\beta$ -mercaptoetanol, el lisado se pasó al menos 5 veces a través de una jeringa de calibre 20 (0.9 mm de diámetro) libre de RNasas, se transfirió la mezcla a una columna ALL Prep DNA para eliminación del DNA genómico y se centrifugó 30 minutos a 8000 g. A continuación, 250  $\mu$ L de etanol 96% se mezclaron con el eluido del paso anterior, se transfirió la mezcla a una columna RNeasy spin column y se centrifugó 15 minutos a 8000 g ( $\geq 10000$  rpm). El sobrenadante se empleó para

precipitar proteínas, adicionando un volumen de tampón de precipitación e incubando la mezcla 10 minutos a Tª ambiente. Se procedió a centrifugar la solución proteica a 16000 g durante 10 minutos, las proteínas precipitadas se lavaron con 500 µl de etanol 70%, se centrifugaron a máxima velocidad 1 minuto y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se resuspendió en el volumen deseado de tampón de carga para proteínas (ver apéndice). El RNA total retenido en la columna, se lavó con 700µl de tampón de lavado y se centrifugó 15 segundos a 8000 g; posteriormente, se realizaron dos lavados con 500 µl del mismo tampón y, finalmente se transfirió la columna a un tubo nuevo libre de RNasas, se eluyó el RNA total por centrifugación con 32 µl de agua libre de RNasas y se conservó a -20° C.

La cuantificación de la cantidad de RNA aislado en cada muestra se llevó a cabo midiendo la Absorbancia a 260nm con espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific), teniendo en cuenta que una unidad de A<sub>260</sub> equivale a 40 µg/mL de RNA. Para la estimación de su pureza, se determinó asimismo la absorbancia de las muestras a 280nm y se obtuvo el cociente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, índice que informa de la pureza del RNA extraído. Valores cercanos a 1.8-2 indican una baja contaminación proteica de nuestra muestra.

La calidad del RNA se evaluó en geles de agarosa al 1%. Se consideró que el RNA estaba degradado (descartándose la muestra) si no se podían distinguir nítidamente las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s y 18s.

#### **3.4.22.3 Transcripción inversa del RNA total de astrocitos de rata**

Dos muestra de RNA total (1µg) fueron incubadas con un tampón especial (*Quantitec Reverse Transcription kit*, Qiagen) para la remoción residual de DNA genómico, durante 2 minutos a 42°C. Después de la eliminación del DNA genómico, se realizó la transcripción inversa (RT) usando *Quantitec Reverse Transcription kit* en 20 µL de reacción, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador BioRad, programado de la siguiente manera: incubación a 42° C

durante 15 minutos, seguido de una incubación a 95° C durante 3 minutos y, finalmente, a 4° C durante 5 minutos. Las muestras se almacenaron en un congelador a -80° C.

El RNA fue analizado para detectar contaminación por DNA genómico utilizando un control para la RT omitiendo la enzima, y un control para valorar la contaminación por reactivos y aerosoles omitiendo el molde.

#### **3.4.22.4 RT-PCR cuantitativa**

Para cuantificar los niveles de mRNA se realizó PCR a tiempo real utilizando el kit *Perfecta®SYBR Green SuperMix for IQ™* (Quanta Biosciences), una mezcla de reacción lista para usar que incluye concentraciones optimizadas de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Accustart Taq polimerasa, fluoróforo SYBR Green I dye, 20 mM de fluoresceína y estabilizadores, a excepción de los cebadores y el cDNA molde. La reacción se llevó a cabo con 50 ng de cDNA total para los transcritos Gls2 de GA (GAB y LGA) y 25 ng de cDNA para los transcritos Gls (KGA y GAC). Los cuatro transcritos fueron amplificados utilizando cebadores isoforma-específicos (véase Apéndice). Antes de la cuantificación de cada mensajero, se estimó la eficiencia de la reacción de PCR con cada pareja de cebadores específicos (estuvo entre el 90-105%), así como su consistencia en las diferentes réplicas. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% y purificados con el kit *Illustra™GFX™ PCR DNA* y el kit de purificación de bandas electroforéticas *Gel Band Purification* (GE Healthcare). La concentración fue determinada por espectrofotometría a 260 nm, como se ha descrito anteriormente. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Se empleó una concentración final de 200 mM de cada cebador específico. El programa de PCR y los ciclos de amplificación se programaron de la siguiente manera: 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 63°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos. La adquisición de la fluorescencia se llevó a cabo a 72°C. La especificidad de los productos de PCR se analizó por

curvas de disociación incluido el control para la RT y el control sin molde. Los resultados fueron Analizados usando el Software CFX (Bio-Rad). El tamaño del amplicón y la ausencia de productos no específicos fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa. Para la cuantificación absoluta de los transcritos GA, el producto de amplificación fue utilizado para calcular el número de copias en nuestra muestra, elaborando curvas estándar de cada producto amplificado a partir de diluciones seriadas 1:10 en el intervalo de  $10^7$  copias hasta  $10^2$  copias de DNA. Se admitieron los valores de curva estándar lineal con un  $R^2 > 0.980$ ,  $r > |-0.990|$ . La eficiencia de cada reacción, E, se calculó con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1}/\text{pendiente}$$

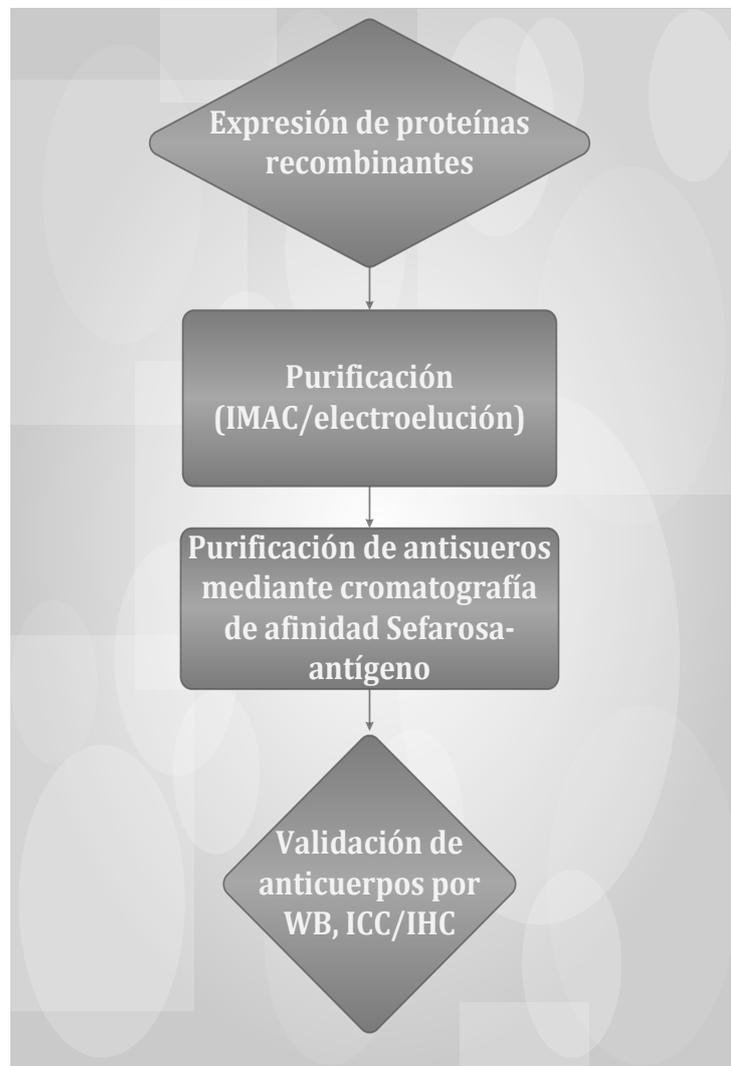
$$\% \text{ eficiencia} = (E - 1) \times 100\%$$



## *Resultados*

#### 4.1 Localización regional y subcelular de las isoformas GAB y KGA en cerebro de rata

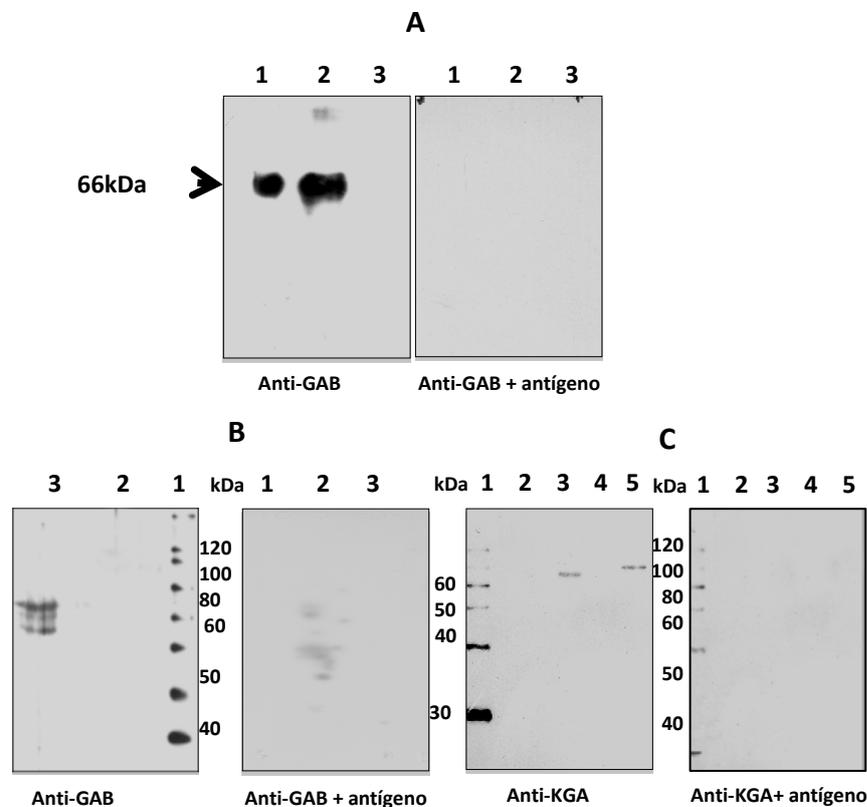
El estudio de la localización regional de las proteínas GAB y KGA en cerebro de rata se llevó a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, inmunocitoquímicas e inmunotransferencias Western. En primer lugar, se obtuvieron y purificaron por cromatografía de afinidad anticuerpos GA isoforma-específicos, utilizando columnas de sefarosa modificadas con los correspondientes antígenos empleados en la inmunización. En el siguiente esquema se resume el procedimiento general seguido desde la generación de los anticuerpos hasta su validación.



**Esquema resumen de la metodología experimental seguida para la obtención de anticuerpos policlonales**

#### 4.1.1 Validación de anticuerpos purificados (anti-KGA y anti-GAB)

Una vez obtenidos y purificados los anticuerpos tal y como se ha descrito en materiales y métodos (apartado 3.4.10), se procedió a evaluar su especificidad. Para ello, se llevaron a cabo inmunotransferencias Western transfiriendo a nitrocelulosa proteínas recombinantes GST-GAB e His-KGA purificadas así como extractos tisulares de hígado y riñón de rata previamente separados por electroforesis. Dichos tejidos contienen las isoformas GAB y KGA casi exclusivamente. En la Figura 7 se exponen los resultados obtenidos.



**Figura (7). Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales de conejo anti-KGA, anti-GAB y policlona de rata anti-GAB mediante Western blot.** Los anticuerpos anti-KGA y anti-GAB se incubaron frente a sus correspondientes antígenos con objeto de valorar su especificidad (a la derecha de cada panel). **A)** Policlona de conejo anti GAB, 1:2000. Calle 1, GAB recombinante; calle 2, extracto total de hígado de rata; calle 3, KGA recombinante. **B)** Policlona de rata anti-GAB, 1:2000. Calle 1; marcador de masa molecular (magicmark); calle 2, KGA recombinante; calle 3, extracto mitocondrial de hígado de rata. **C)** Policlona de conejo anti-His-KGA C-terminal, 1:1000. Calle 1, magicmark; calle 2, GAB recombinante; Calle 3, extracto total de cerebro de rata; calle 4, extracto total de hígado de rata; calle 5, extracto mitocondrial de riñón de rata. Se cargaron 10 ng de las proteínas de fusión GST-GAB e His-KGA y 20  $\mu$ g de extractos de mitocondrias de hígado y riñón de rata. La inmunotransferencia se reveló mediante quimioluminiscencia, con el sistema *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce).

En todos los casos, la preadsorción de los anticuerpos purificados con el antígeno empleado en su producción eliminó completamente el reconocimiento de las isoenzimas GA, tanto en inmunotransferencia Western, como en ensayos inmunohistoquímicos en cerebro de rata. El anticuerpo policlonal de conejo frente a GAB dio una señal más intensa (a las diluciones optimizadas) en inmunotransferencia Western que el correspondiente policlonal de rata.

Los anticuerpos demostraron ser isoenzima específicos a las diluciones empleadas, no detectándose reconocimiento cruzado entre isoenzimas GA al emplear proteínas recombinantes purificadas o extractos tisulares.

#### **4.1.2. Caracterización inmunohistoquímica (IHC) de isoenzimas GA en cerebro de rata**

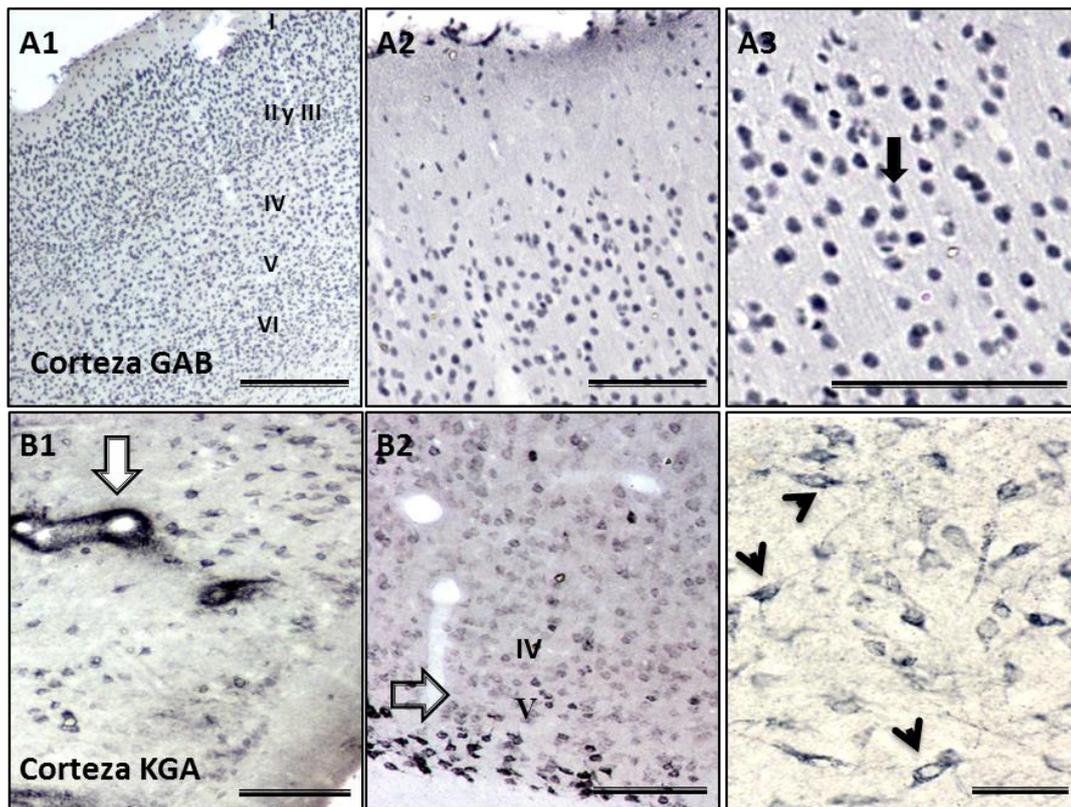
##### **4.1.2.1. Expresión regional de KGA y GAB en cerebro de rata**

A nivel regional, ambos tipos de anticuerpos detectaron una mayor expresión de isoenzimas KGA y GAB en regiones implicadas en la neurotransmisión glutamatérgica como corteza cerebral, hipocampo, cerebelo y estriado, de forma similar a lo encontrado previamente por nuestro grupo empleando otros anticuerpos anti-GA (Olalla, 2002; Olalla *et al.*, 2002). En la corteza cerebral, se observó una intensa inmunorreactividad GAB nuclear con un mismo patrón de marcaje en todas las regiones que la constituyen; frontal, temporal, parietal y occipital (Fig. 8). Así, se observó marcaje en el núcleo de numerosas células distribuidas por todas las capas corticales (I-VI), siendo el marcaje de la capa I menos intenso que en las demás.

A diferencia de la marca obtenida con anticuerpos GAB, la inmunotinción específica observada con los anti-KGA mostró una localización celular citoplasmática, concentrándose en somas y porciones iniciales de las dendritas primarias (Fig. 8 B3). Aunque se detectó expresión de KGA en todas las capas corticales, las células piramidales (glutamatérgicas) de las capas IV y V exhibieron una mayor intensidad de tinción con respecto a las demás capas corticales (Fig. 8 B2). La mayoría de las neuronas reactivas son piramidales, no obstante, se observaron neuronas reactivas de morfología no piramidal (Fig. 8 B1-B3).

Además, se apreció inmunotinción KGA en el neuropilo (compuesto de un ovillo denso de terminales axónicos, dendritas y células gliales) de aspecto punteado, en todas las capas corticales.

El patrón de tinción de ambas isoformas (GAB nuclear y KGA mitocondrial) fue similar al observado en otras regiones cerebrales.

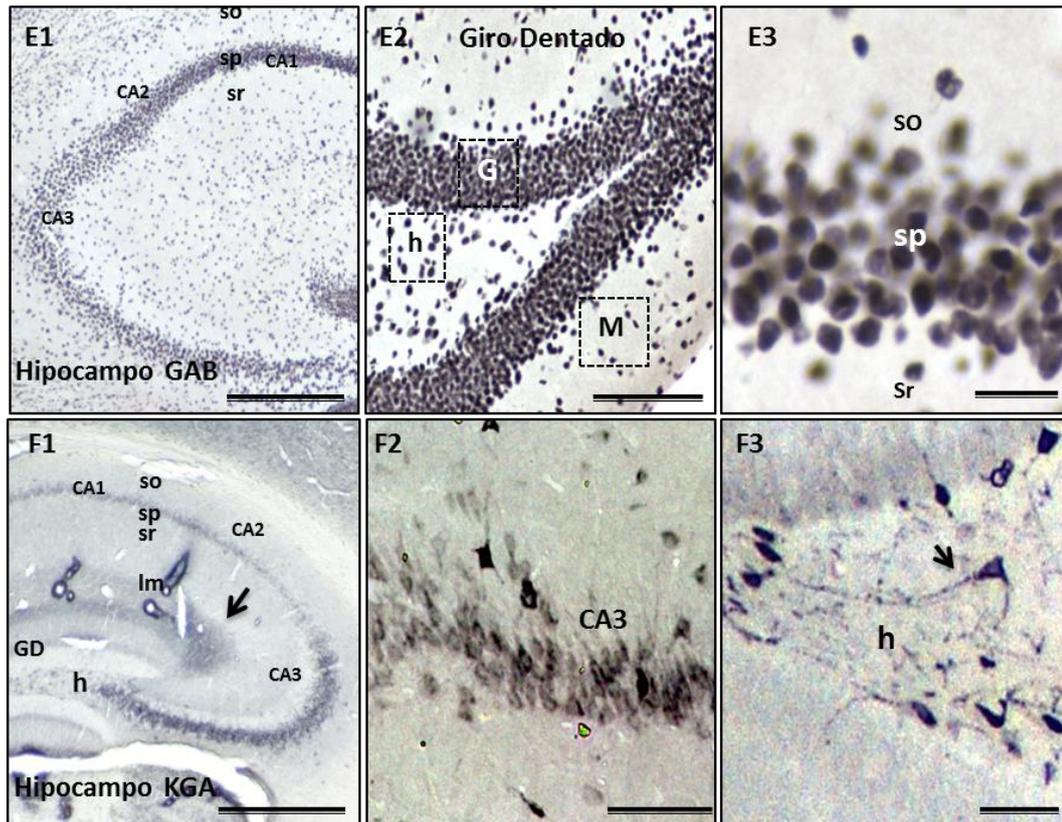


**Figura (8).** Localización inmunohistoquímica de las isoformas GAB (A) y KGA (B) en la corteza de cerebro de rata. GAB (A1-A3) se concentra fundamentalmente en la región nuclear de numerosas células distribuidas por todas las capas corticales, siendo menos abundante en la capa I. A3) Imagen ampliada de la marca nuclear. (B1-B2) Imagen panorámica de la tinción KGA y detalle del marcaje perivascular (flecha blanca, B1). La isoforma KGA se localiza en el citoplasma de los cuerpos neuronales y porciones iniciales de las dendritas primarias de las neuronas corticales (flechas negras, B3), mostrando una mayor expresión las neuronas piramidales localizadas en las capas IV y V (flecha abierta, B2). Barra de escala: A1) 250µm; A2-3) 100 µm; B1-3) 100 µm.

En el hipocampo (región implicada en procesos de aprendizaje y memoria) se observó un patrón de expresión diferente para isoenzimas GAB y KGA (Fig. 9). El hipocampo está formado por el asta de Ammon (también denominada hipocampo propio), el giro dentado y el subículo. La región hipocámpal está constituida por tres capas: la capa piramidal, formada por el estrato piramidal CA (*Cornu Ammonis*) que se divide a su vez en los subcampos CA1, CA2 y CA3 e hilus (h), en los cuales se encuentran las células piramidales. El segundo estrato es el radiado (Sr), contiene las dendritas apicales de las células piramidales, un estrato oriens (SO) compuesto por dendritas basales de las células piramidales y finalmente, la capa más distante de estas dendritas denominada lacunoso molecular (LM). El giro dentado está compuesto por la

capa molecular sináptica, la capa granular; que contiene el soma de las células granulares, y la región hilar o hilus, que contiene las células polimórficas. Como se puede observar en la Figura 9 E1-3, GAB se localiza en el núcleo de células del estrato piramidal de todos los subcampos del asta de *Ammon*, de naturaleza glutamatérgica, y además en células distribuidas por Sr, LM y SO (Fig. 9 E3). Asimismo, en el giro dentado se pudo distinguir inmunorreactividad GAB en el nucleoplasma de las células de la capa granular (formada por somas densamente empaquetados de células de proyección), la capa molecular y la región hilar (Fig. 9 E2).

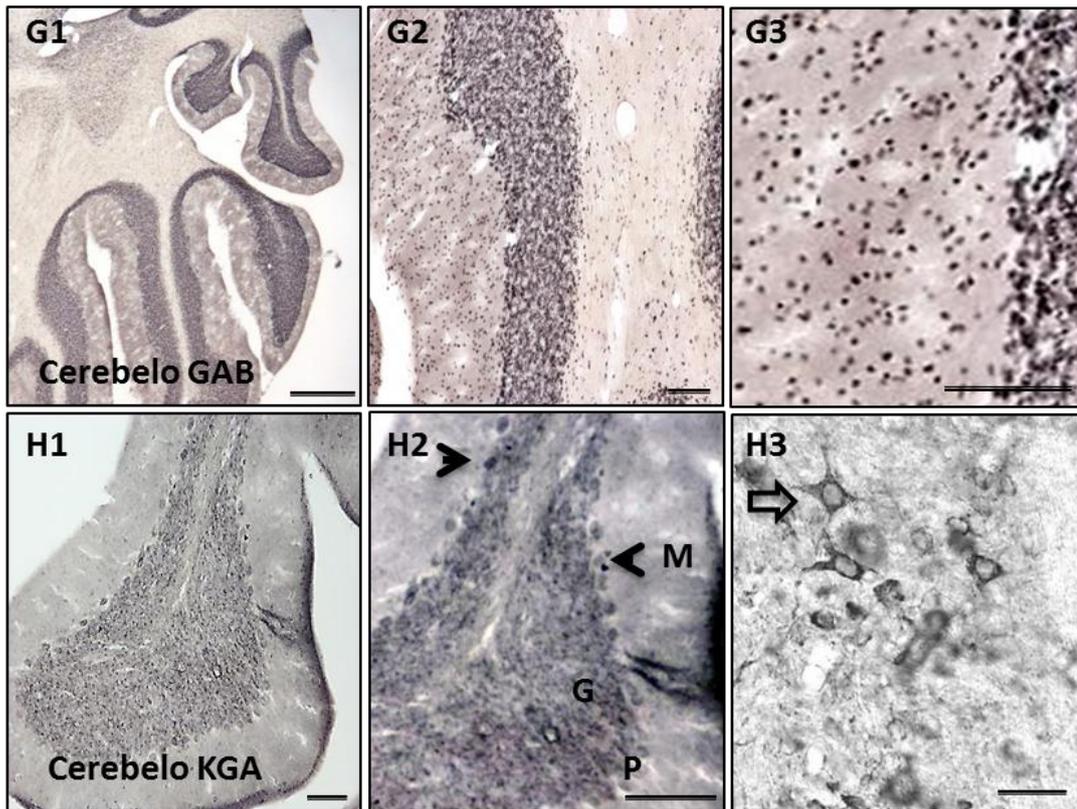
La isoforma KGA mostró una distribución diferencial en el asta de *Ammon*, siendo en el subcampo CA3 (Fig. 9 F1) el que mayor intensidad de marcaje mostró y CA1 el que menor (Fig. 9 F1). En el subcampo CA3, la inmunotinción se localiza en las células del estrato piramidal (Fig. 9 F2). También se detectó una región KGA inmunorreactiva en LM (Fig. 9 F1), intensa en el subcampo CA3 (Fig. 9 F2). En el giro dentado, la inmunorreactividad KGA se localizó en las células granulares, siendo éstas más intensa en células multipolares de la región hilar (Fig. 9 F3h).



**Figura (9). Inmunorreactividad de GAB (E) y KGA (F) en hipocampo de rata.** El patrón de expresión nuclear para GAB fue uniforme en las regiones hipocámpales observadas. La isoenzima KGA se expresó con mayor intensidad en las neuronas piramidales del subcampo CA3 (F2), siendo menos intensa en CA2 y CA1 (F1). F3) Las neuronas hipocámpales del hilus (h) expresan KGA (flecha, F3). E3) Detalle de marca nuclear de GAB en la capa granular del giro dentado y reactividad para los subcampos del asta de Ammon; GD, giro dentado; G, granular del giro dentado; S, subículo; h, hilus; Im, lacunoso-molecular; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; Sr, estrato radiado; M, capa molecular. Barra de escala: E1) 250  $\mu$ m; E2) 50  $\mu$ m; E3) 10  $\mu$ m; F1) 250  $\mu$ m; F3) 100  $\mu$ m.

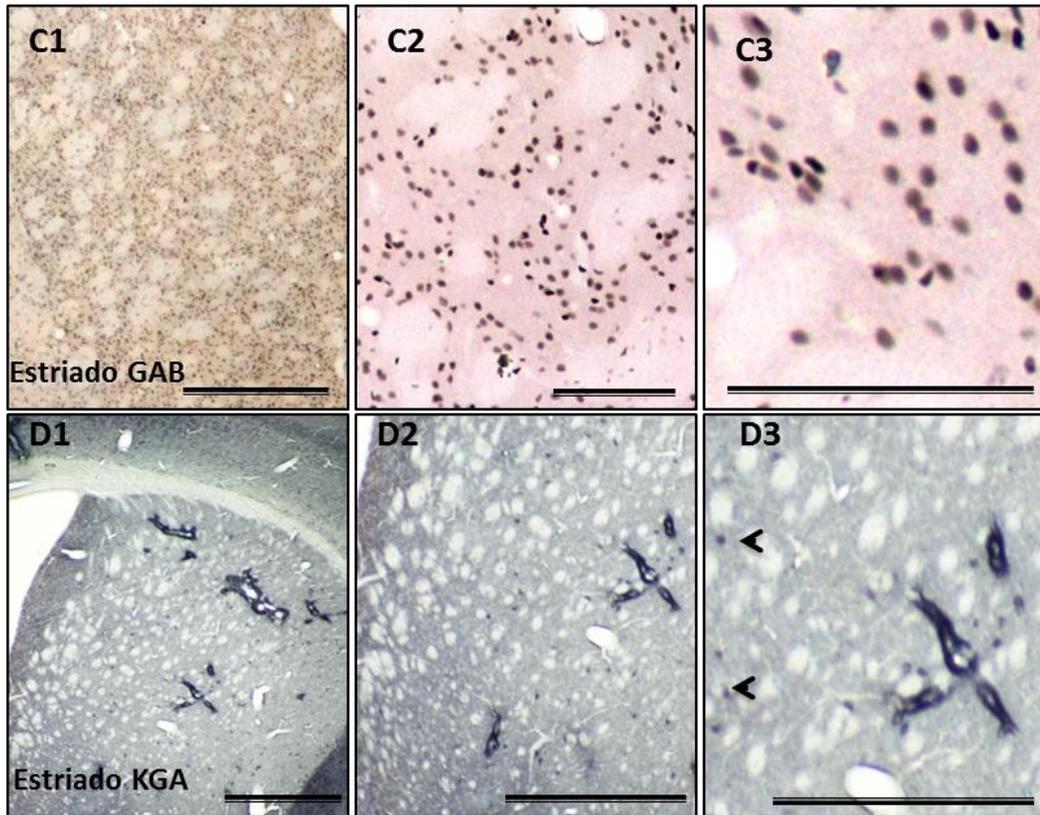
En el cerebelo se detectó una fuerte inmunorreactividad de las isoformas GAB y KGA. La corteza cerebelosa está constituida por tres capas. Una capa externa denominada capa molecular, la capa media; constituida por las neuronas de Purkinje y la capa interna conocida como capa granular. La capa molecular se compone de las células estrelladas y en cesto, neuronas de naturaleza GABAérgica. Estas neuronas son poco numerosas y se encuentran distribuidas entre las arborizaciones dendríticas de las neuronas de las capas más profundas y las fibras paralelas. La capa de las células de Purkinje está formada por un sólo estrato de neuronas inhibitoras GABAérgicas. Las dendritas de estas neuronas se expanden sobre la capa molecular transversalmente al eje longitudinal de la

laminilla cortical. La capa granular está formada por numerosas neuronas pequeñas, con escaso citoplasma y de naturaleza glutamatérgica denominadas células granulares. Además, se encuentran algunas neuronas inhibitoras tipo Golgi: sus dendritas en la capa molecular y sus axones establecen sinapsis con las dendritas de las células granulares. Los axones de las células granulares se dirigen a la capa molecular. La inmunorreactividad GAB nuclear se localizó con mayor intensidad a nivel de la capa granular (Fig. 10 G). En contraste, se observaron núcleos inmunomarcados en la capa de Purkinje, de tamaño pequeño. En la capa molecular también se observaron núcleos inmunopositivos para GAB pertenecientes a las células inhibitoras GABAérgicas de esta zona. Por otra parte, la isoforma KGA en el cerebelo se concentró en las células glutamatérgicas granulares y en células GABAérgicas de la capa molecular (Fig. 10 H3). Las células de Purkinje también expresan KGA (flecha 10 H1-2).



**Figura (10). Inmunorreactividad GAB (G) y KGA (H) en cerebelo de rata.** La isoformas GAB se localizan en núcleos de numerosas células de la capa granular y la capa molecular (**G1-3**). KGA se expresa con un patrón similar a GAB, siendo las células granulares y las células de la capa molecular las más reactivas (**H1-3**). Las células de Purkinje (**H2** flechas) son reactivas para la isoforma KGA. M, capa molecular; G, capa granular; P, células de Purkinje. (**H3**) detalle de la marca granulada de KGA en neuronas de la corteza cerebelosa (flecha abierta). Barra de escala: G1, 250  $\mu$ m; G2, 100  $\mu$ m; G3, 100  $\mu$ m; H1, 100  $\mu$ m; H2, imagen ampliada; (G3-H3), 20  $\mu$ m.

En el estriado, residen las aferencias glutamatérgicas procedentes de la corteza cerebral, y dopaminérgica, procedentes de la sustancia negra. Esta estructura cerebral forma parte de un sistema funcional mayor, llamado ganglios basales (constituido por el estriado, globo pálido, núcleos subtalámicos, núcleo entopeduncular y la sustancia negra) que participa en el comportamiento motor, cognitivo y emocional. En esta área cerebral se observó igualmente un marcaje nuclear de GAB y una marca mayoritaria de KGA en el neuropilo, de aspecto puentado (Fig. 11D). Se observaron también algunos somas inmunoreactivos de una pequeña población neuronal (Fig. 11F3).



**Figura (11). Inmunorreactividad de GAB (C) y KGA (D) en el estriado de rata.** La marca GAB se localiza en el núcleo de muchas neuronas estriatales (C1-3). La marca correspondiente a la isoforma KGA, presenta una fuerte tinción en el neuropilo (D1-3). Barra de escala: C2-3, 100  $\mu$ m; C1, D1-3, 1mm.

#### **4.2 Expresión de GA en células gliales**

En un estudio pionero de microscopía electrónica realizado por Aoki y colaboradores (1991), se detectó la existencia de GA en poblaciones discretas de astrocitos, en concreto, esta marca fue observada en procesos gliales, espinas dendríticas y axones, mediante estudios de microscopía electrónica, empleando anticuerpos anti-KGA. En el mismo año, Wurdig y Kugler, usando GDH como enzima auxiliar, demostraron la presencia de una fuerte reactividad GA en la glía de Bergmann, glomera cerebelosa, *perikarya* granular, células de Purkinje y en procesos astrocitarios. Asimismo, resultados previos de nuestro grupo de investigación habían demostrado inmunotinción específica GA en células gliales (Olalla, 2002).

##### **4.2.1 Actividad GA en astrocitos de cerebelo de rata**

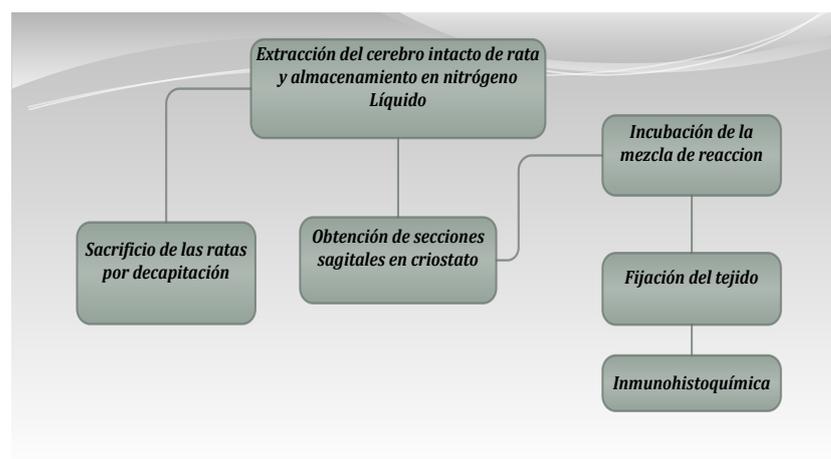
Experimentos de inmunofluorescencia confocal realizados por nuestro grupo de investigación en corteza cerebral de rata, mostraron la existencia de colocalización de las proteínas GIP y GAB en cuerpos celulares y procesos de astrocitos, así como en pies perivásculares (Olalla *et al.*, 2008). Con estos datos como punto de partida y dada la fuerte controversia científica que rodea a este asunto, en este trabajo nos propusimos analizar el patrón de expresión de isoenzimas GA en células gliales de una forma más detallada, abarcando tanto el nivel transcripcional (niveles de mRNA) como el traduccional (detección de proteínas y actividad enzimática).

La actividad enzimática de GA está regulada por una variedad de compuestos que pueden activar (Pi, calcio, algunos miembros de TCA, tiroxina, acetil aspartato y acetil glutamato) o inhibir (Glu) la actividad enzimática (Kvamme *et al.*, 2008). Los efectos sobre la enzima purificada (Svenneby *et al.*, 1970), son algunas veces diferentes a los encontrados en homogenatos, rodajas de cerebro, sinaptosomas y mitocondrias asiladas de cerebro de rata (kvamme *et al.*, 2008; Malherbe *et al.*, 1972).

Hasta la fecha, no se ha comprobado una actividad enzimática “in vivo”, razón por la cual, la actividad enzimática en cultivos primarios de astrocitos, parece ser inducida por la Gln presente en el medio que se emplea para su mantenimiento (Erecinska and Silver, 1990). Sin embargo, una elevada actividad GA no puede asociarse a una estimulación provocada por el sustrato, ya que se ha comprobado que un incremento en la concentración del mismo no produjo efecto en la actividad enzimática GA (Kvamme *et al*, 1982). Un resultado interesante a tener en cuenta en estos estudios es que, en cultivos primarios de células SHSY-5Y, se observó una elevada actividad GA (kvamme *et al.*, 2008), no concordante con la expresión de proteínas KGA o GAB en homogenatos de estas líneas celulares.

Con el fin de confirmar la presencia de actividad catalítica de GA “in vivo” en astrocitos de cerebro de rata (no demostrada actualmente), se realizaron extracciones de cerebro en condiciones que permitieron preservar al máximo el tejido.

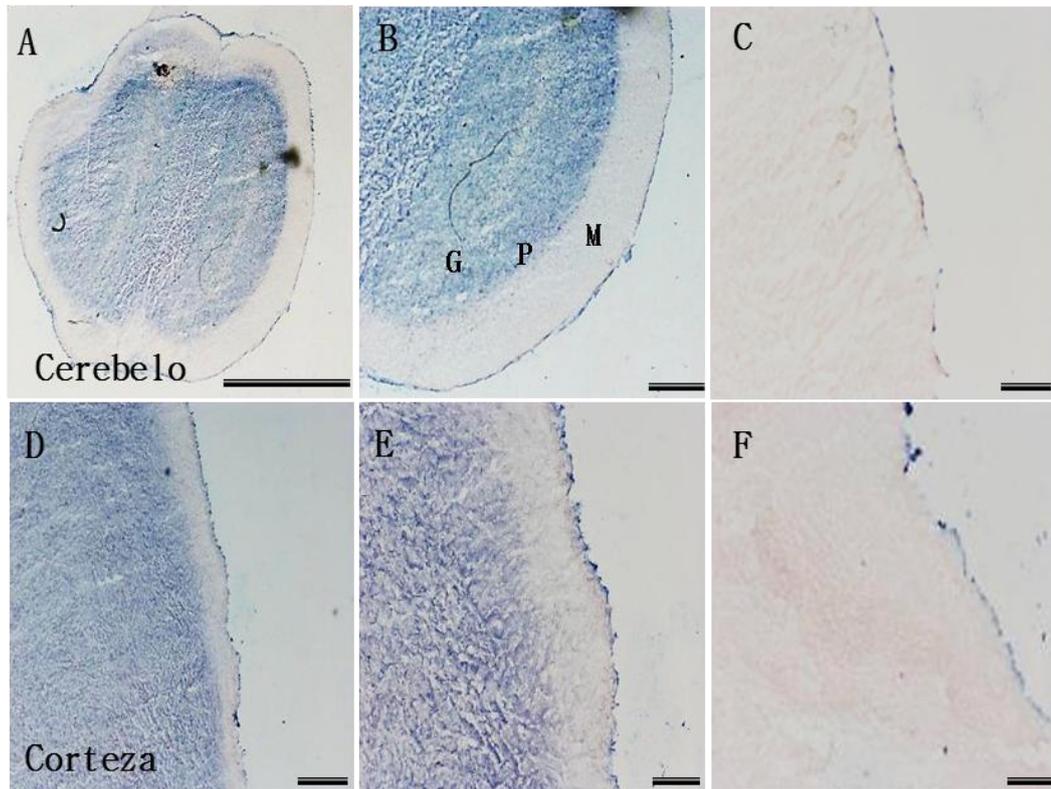
El esquema que se muestra a continuación resume el procedimiento desde la extracción del tejido hasta el análisis. Una visión más detallada puede observarse en materiales y métodos (apartado 3.4.16).



**El esquema resume el procedimiento seguido para el análisis de la actividad GA “in situ” en cerebro de rata**

Para medir la actividad GA se empleó entonces el método descrito por Montero *et al.* (2007), una modificación del protocolo original publicado por Aledo *et al.* (1993), para medir *in situ* la actividad GA. Este método se basa en detectar la actividad GA mediante la formación de un precipitado azul de formazano (apartado 3.4.16.4, metodología experimental). El precipitado de color azul-púrpura de la reacción histoquímica, se localiza preferencialmente de forma dispersa en agrupaciones celulares localizadas en todas las regiones cerebrales (Fig. 12 y 13).

Para determinar la especificidad de la técnica histoquímica, los cortes de cerebro se procesaron simultáneamente junto a dos cortes consecutivos que se emplearon como controles negativos, en los que se omitió del medio de incubación en un caso, la Gln sustrato de la reacción, y en el otro el fosfato (Pi), activador necesario para la actividad GA (Fig. 12).



**Figura (12). La reacción histoquímica para actividad GA es específica.** Tinción de actividad enzimática GA en cerebelo de rata (**A y B**); corteza (**D y E**). Al omitir la Gln, sustrato esencial para la GA, no se detecta señal (**C**). Al suprimir el Pi, se ve una muy leve tinción residual probablemente debido al fosfato endógeno (**F**). Grosor de los cortes: 20  $\mu\text{m}$ . Barra de escala: A) 1mm; B y E) 250  $\mu\text{m}$ ; D, E y F) 100  $\mu\text{m}$ .

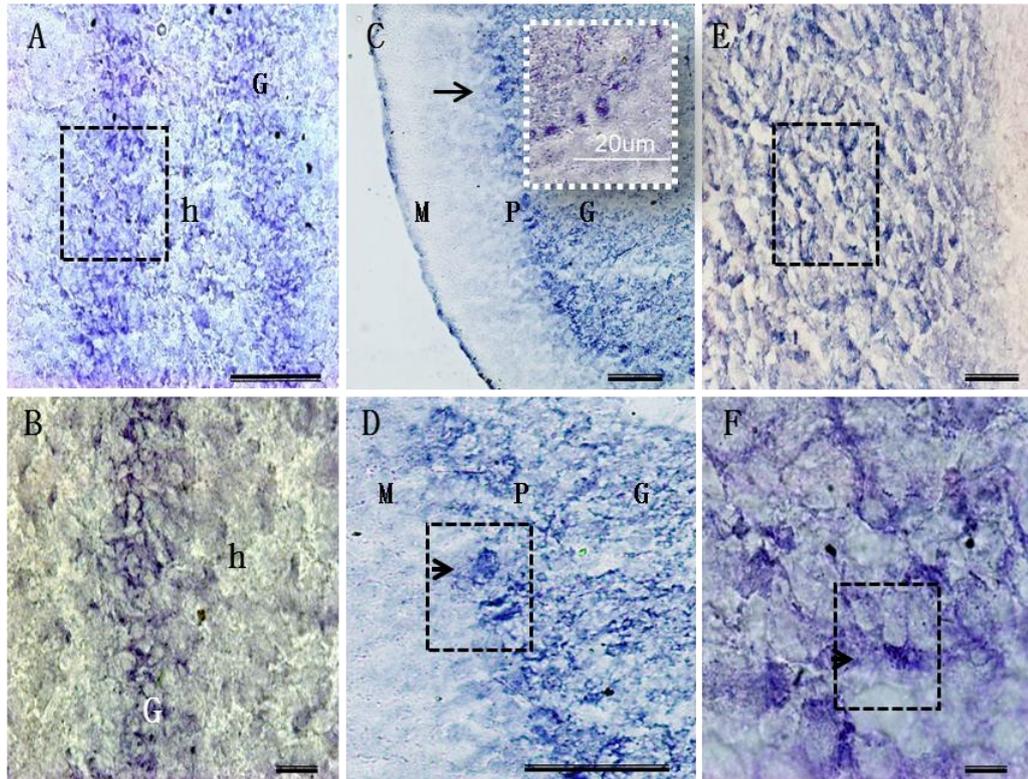
Como puede comprobarse en cerebelo y corteza, al omitir el fosfato la tinción GA disminuyó drásticamente observándose una ligera reactividad basal generada probablemente por el fosfato endógeno. Los resultados obtenidos en secciones de cerebro han sido siempre repetitivos, obteniéndose una tinción generalizada y heterogénea en las regiones analizadas.

La mayor actividad GA se detectó usando una concentración de 40 mM para Gln y 80 U.I. de la enzima auxiliar GDH. Al incorporar en el medio de incubación un agente inhibidor de la cadena de transporte electrónico como la azida sódica (que evita el paso de electrones del NADH hacia el oxígeno a través de la cadena respiratoria), concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no superiores a 10 mM y tiempos de incubación de 30 minutos, la tinción aumento de forma considerable (resultados no mostrados), al igual que el ruido de fondo.

De igual forma, tiempos de incubación más prolongados (40 minutos) omitiendo estos dos reactivos, fueron también suficientes para la obtención de un patrón de tinción específico (Fig. 12), aunque el deterioro del tejido aumentó de forma proporcional al tiempo de incubación.

En cerebelo, la mayor actividad GA se observó en la capa granular, en somas o pericaria granular y en células de Purkinje (Fig. 13 C). La actividad enzimática GA de la corteza fue intensa y generalizada en todas las capas corticales (I-VI). En hipocampo, y concretamente en la capa granular, se observó actividad GA citoplasmática de neuronas con apariencia granular, probablemente asociada a mitocondria.

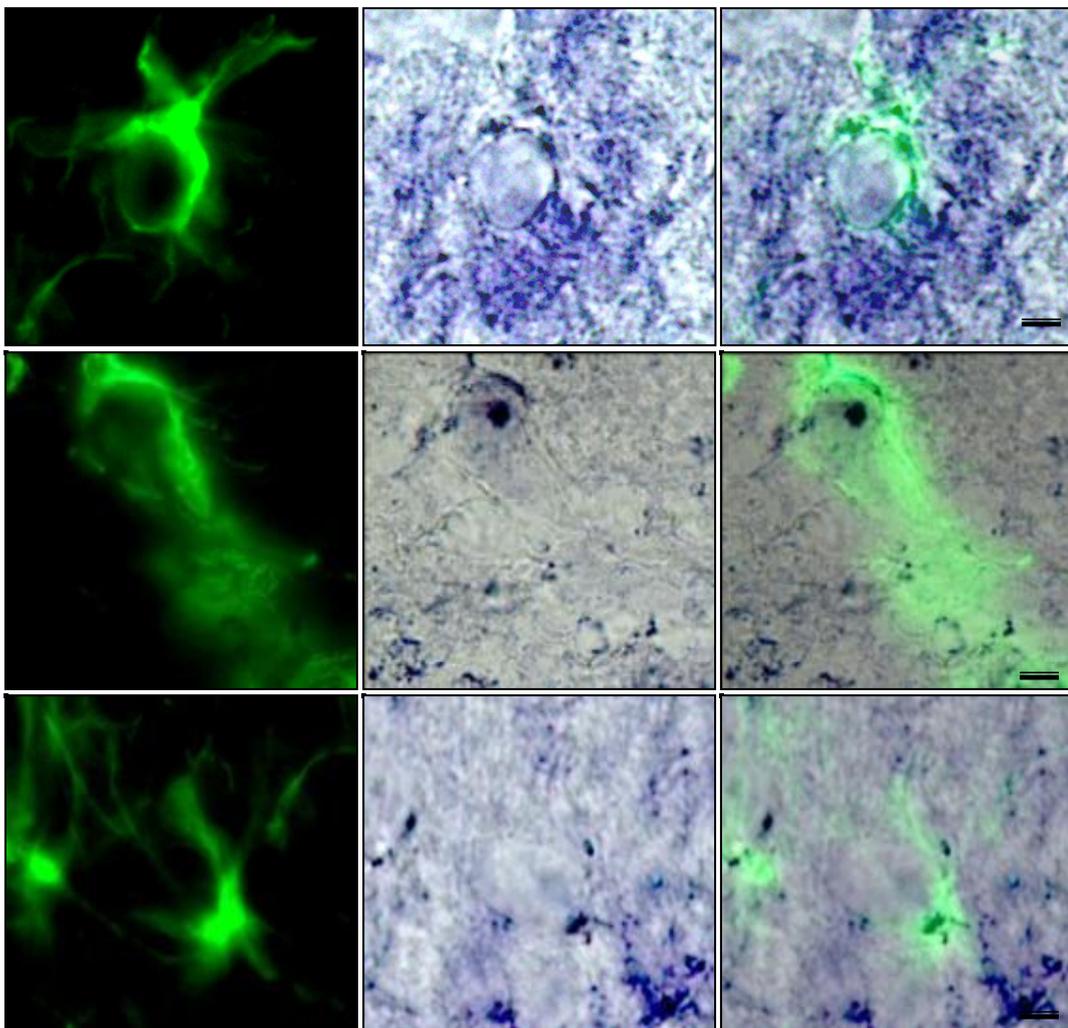
La tinción fue específica del citosol, somas de algunas células de Purkinje, aparentemente mitocondrial en la capa granular del hipocampo, abundante en el neuropilo de la neocorteza y específica de la capa granular del cerebelo y glía de Beckmann (Fig. 12 y 13). Estos resultados confirman que el patrón de distribución de la actividad GA es heterogéneo. Además, no se observaron núcleos claramente reactivos en ninguna de las áreas analizadas.



**Figura (13). Actividad GA presente en cerebro de rata.** **A)** Imagen panorámica de secciones de hipocampo (giro dentado). **B)** Detalle de la capa granular del giro dentado. Se observó una alta reactividad en neuronas a nivel citoplasmático, de aspecto granular y perinuclear, lo que supone una actividad GA mitocondrial. **C)** Se observa una fuerte tinción en la capa granular y células de Purkinje (imagen recuadrada) y una tinción tenue, casi nula en la capa molecular de cerebelo de rata. **D)** Detalle de la tinción de la capa que contiene las células de Purkinje (flecha) y capa granular. **E)** Imagen de la corteza, en donde se observa una fuerte tinción diferencial entre la capa periférica y las capas internas corticales. **F)** Detalle de la tinción de actividad, de aspecto granular en la corteza (flecha). GD, giro dentado; h, hilus; M, molecular; P, Purkinje; G, granular. Barra de escala: (A, y C) 100 µm; E), 50µm; (B y F), 20 µm.

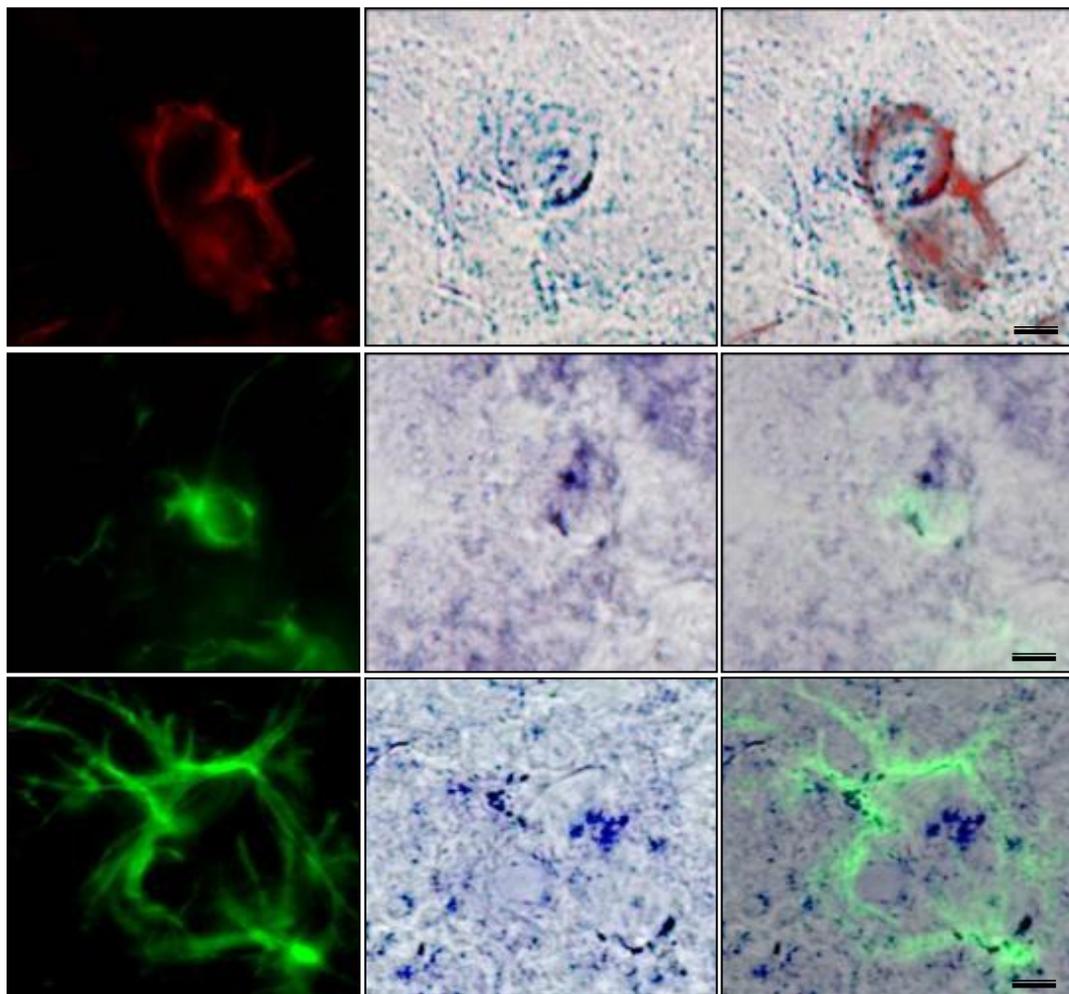
#### 4.2.2 Identificación de actividad GA en astrocitos

Para ver la presencia de actividad GA en astrocitos, se realizaron marcajes inmunofluorescentes con GFAP en las mismas secciones empleadas para identificar la actividad enzimática GA, tomándose imágenes a campo claro y con epifluorescencia para revelar el marcaje de células astrocitarias. Los resultados demuestran que algunos astrocitos asociados a la corteza y al cerebelo, concretamente en la capa granular y en la corteza, presentan actividad GA positiva, tal y como se observa en la Figura 14.



**Figura (14). Identificación de astrocitos en cerebelo de rata que presentan una clara actividad GA.** Localización de la inmunofluorescencia con anti-GFAP (verde) posterior al tratamiento histoquímico para detectar actividad GA en cerebelo de rata. Se observaron algunos astrocitos con reactividad en la capa granular del cerebelo. Barra de escala: 10  $\mu$ m en todos los paneles.

La tinción histoquímica se preservó durante las incubaciones del tratamiento inmunohistoquímico; realizado sobre los cortes preincubados con la mezcla de reacción para detectar actividad enzimática. Los resultados demuestran claramente que algunos astrocitos corticales manifiestan actividad GA (Fig. 15). El aspecto de la tinción es similar en todas las poblaciones celulares observadas, no obstante, las estructuras granulares identificadas en estas poblaciones astrogiales parecen ser menos abundantes, comparado con las identificadas en neuronas (Fig. 15).

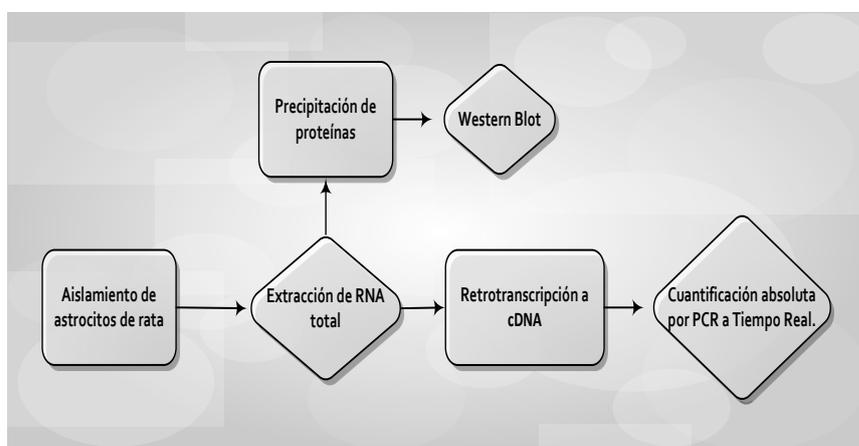


**Figura (15). Identificación de astrocitos (verde/rojo) en corteza de rata que presentan una clara actividad GA.** La apariencia de la marca es granular en células que se encuentran rodeando estructuras neuronales. Barra de escala: 10  $\mu$ m en todos los paneles.

### 4.2.3 Cuantificación absoluta del mRNA de isoenzimas GA en astrocitos

Para demostrar con mayor precisión que isoenzima de GA se expresa en astrocitos de rata, realizamos la medida de los mensajeros mediante qRT-PCR a tiempo real a partir de RNA total extraído de astrocitos de cerebelo, región en la que se observó una tinción fuerte de la actividad GA y donde se ha reportado previamente la existencia de la misma por otros autores (Wurdig y Kugler, 1991).

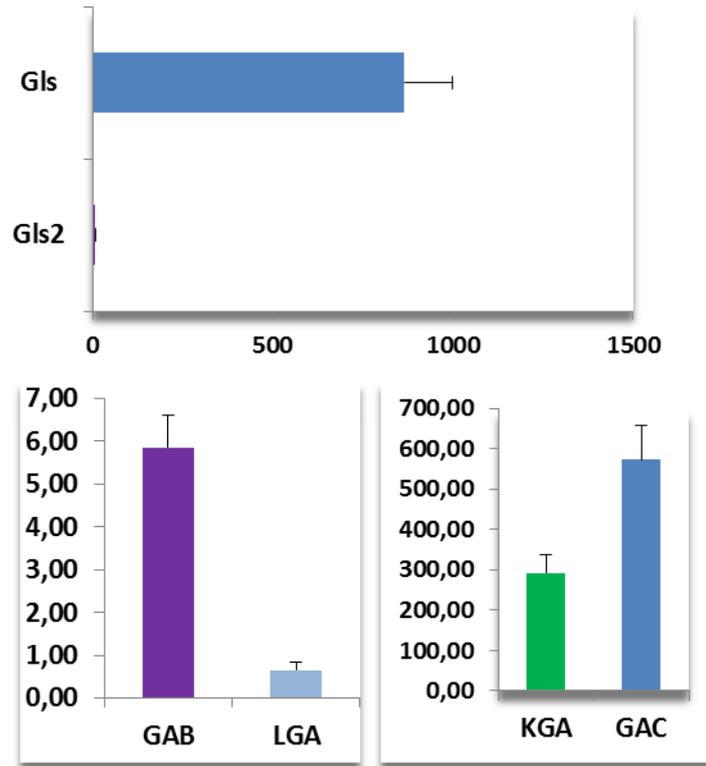
El siguiente esquema resume el procedimiento seguido, el cual esta descrito con mayor detalle en el apartado 3.4.22 de metodología experimental.



**Esquema ilustrativo de la metodología seguida para la valoración de los transcritos GA en astrocitos aislados de cerebelo de rata**

Se llevó a cabo una técnica de retrotranscripción y PCR en dos pasos. En primer lugar, a partir de RNA total se retrotranscribió el mRNA a cDNA y, a continuación, éste se amplificó por PCR.

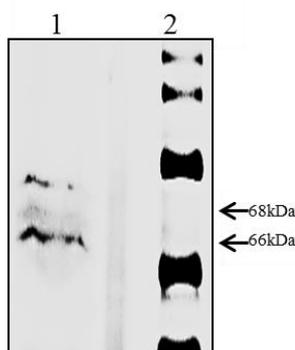
En la figura 16, se observa la coexpresión de mRNA para las cuatro isoformas de GA (KGA, GAC, LGA y GAB) en astrocitos de cerebelo de rata. Los mensajeros Gls predominan sobre Gls2, siendo GAC el mayoritario ( $572.133 \pm 86.37$ ) y con unos valores que duplican al transcrito KGA ( $292.133 \pm 45.95$ ). En relación con los transcritos Gls2, GAB es el transcrito más abundante ( $5.4 \pm 0.77$ ) con respecto a LGA ( $0.652 \pm 0.197$ ). Para calcular el número de copias de los mensajeros de GLS2 se utilizó el doble de RNA que para los de Gls, 50 y 25 ng respectivamente.



**Figura (16).** Niveles de expresión de mRNA de GAB (lila), LGA (azul claro), KGA (verde) y GAC (azul) en cerebelo de rata. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.D ( $n = 3$ ). El número de copias totales se normalizó frente a nano gramos de RNA total. Panel superior: número de copias de transcritos Gls (KGA+GAC) frente a transcritos Gls2 (GAB+LGA). Panel inferior: número total de copias de cada transcrito GA normalizado a la cantidad total de RNA.

#### 4.2.4 Detección de isoformas GA en astrocitos de cerebelo de rata

Las proteínas precipitadas de la fracción eluida del protocolo de extracción de DNA genómico y RNA total (véase metodología experimental, apartado 3.4.22.2), se lavaron para retirar los restos del tiocianato de guanidina utilizado para la inactivación de RNAsas. A continuación, las proteínas se resuspendieron en tampón de carga 2X y se separaron por electroforesis SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección con anticuerpos específicos anti-KGA. De esta forma, se observó una inmunorreactividad positiva pudiéndose detectar bandas correspondientes a masas moleculares aparentes en torno a 66-68 kDa, tal y como se puede observar en la Figura 17.



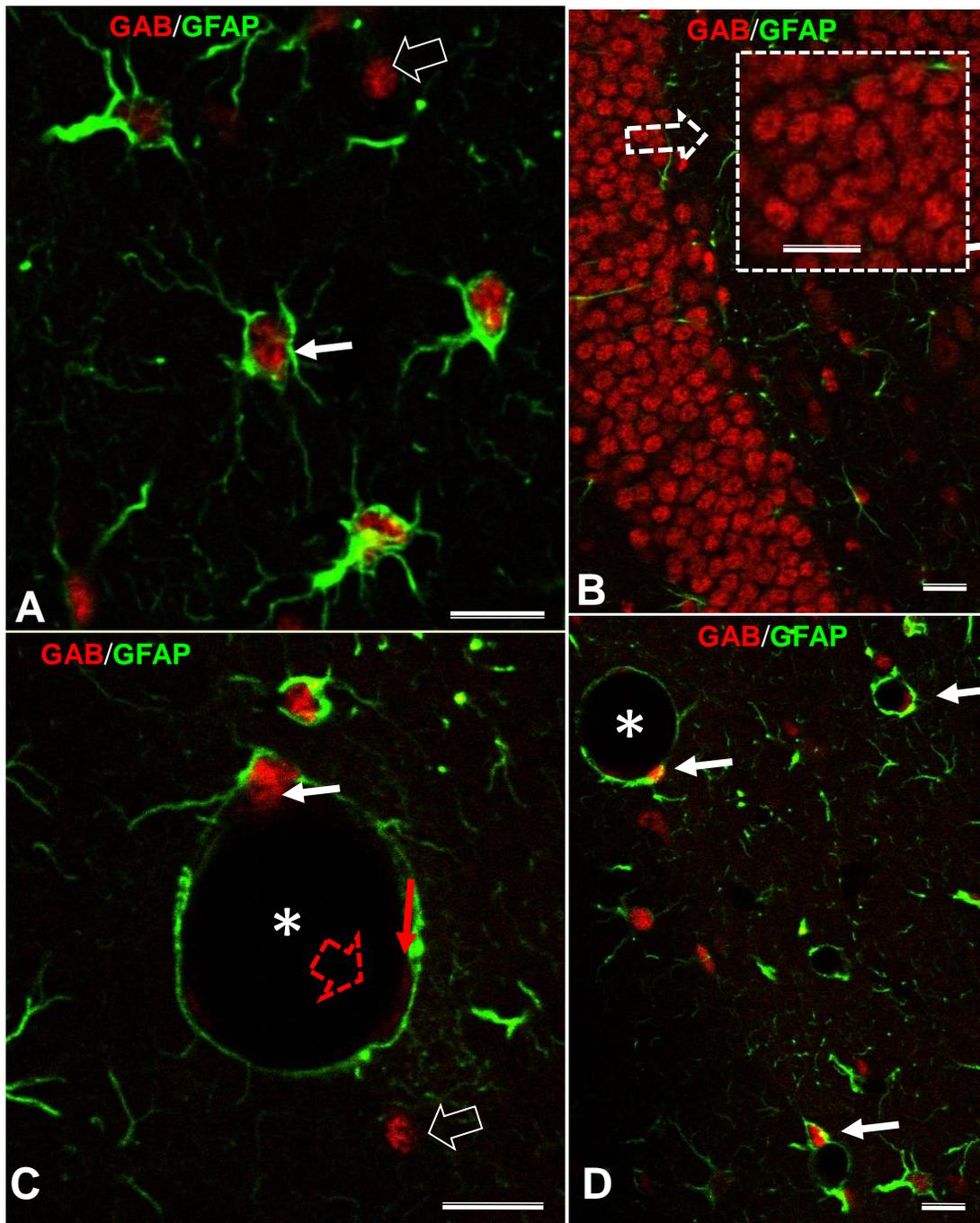
**Figura (17).** SDS-PAGE y Western blot de las proteínas precipitadas de cerebelo de rata (40 $\mu$ g): calle 2, magicmark, calle 1, extracto total de astrocitos de rata. La membrana se incubó con un anticuerpo desarrollado frente a la proteína His-KGA/región c-terminal.

La isoforma KGA activa es un heterotetrámero constituido por 3 subunidades de 65 kDa y una de 68 kDa (Perera *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 1991). Parece detectarse una banda débil de aproximadamente 74 kDa que coincide con el tamaño teórico de la banda precursora mitocondrial de KGA. Al ser astrocitos de cerebelo de rata neonatal (P0), etapa temprana del desarrollo, es posible que la maquinaria biosintética de procesamiento mitocondrial no esté completamente desarrollada, por lo que podría acumularse la proteína precursora junto con la proteína madura.

#### 4.2.5 Localización de GAB y KGA en astrocitos de rata

Se llevó a cabo la inmunocitoquímica mediante microscopía electrónica y dobles marcajes inmunofluorescentes usando anticuerpos anti-GAB o anti-KGA, con el fin de identificar si hay una correlación entre la expresión de proteínas GA y los niveles de mensajero (reportados en el apartado anterior), en astrocitos marcados específicamente con anti-GFAP.

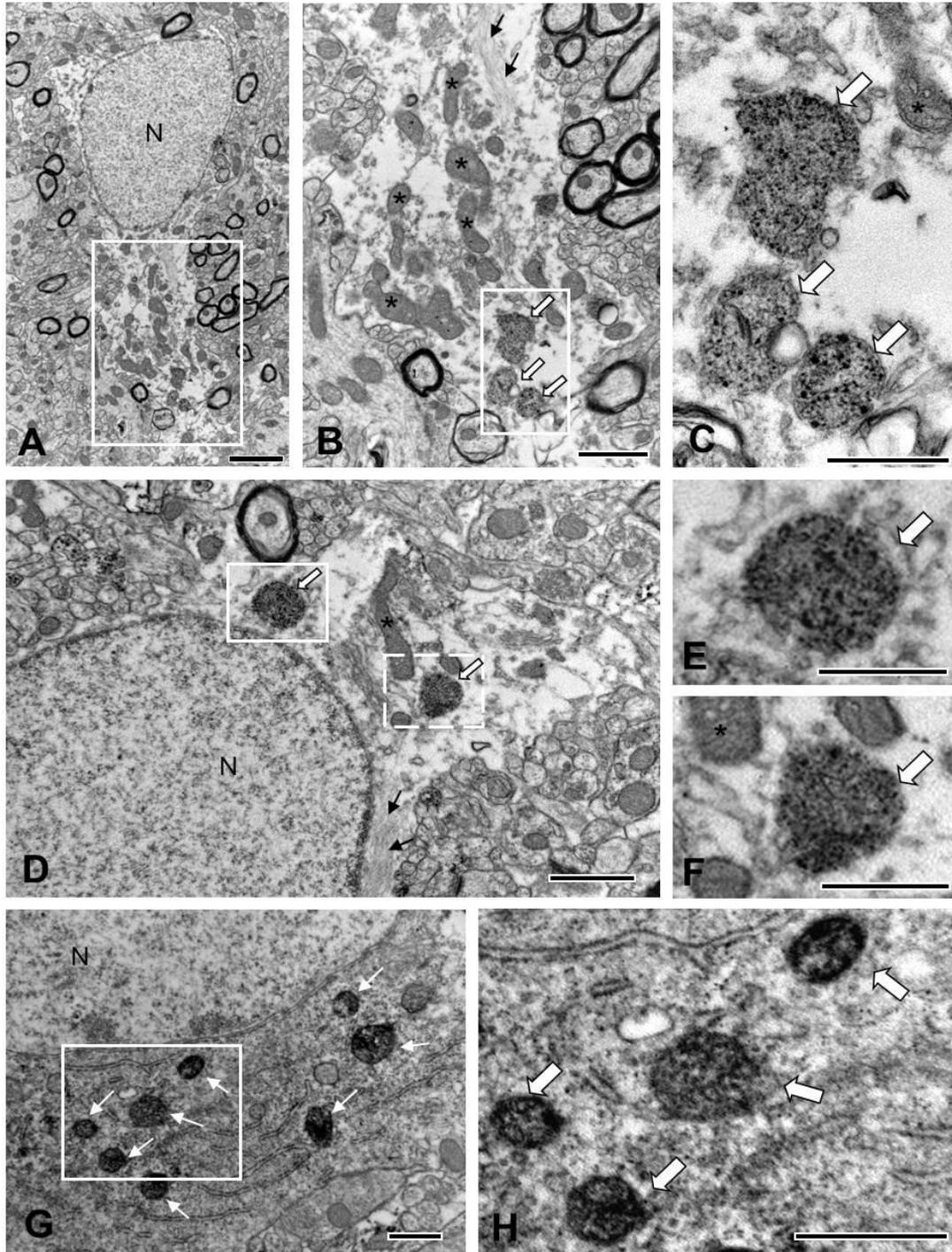
El doble marcaje inmunofluorescente (GAB-GFAP) se realizó en cortes coronales de cerebro de rata. En la Figura 18 se observa en la región hipocámpal una abundante reactividad de GAB en núcleos de astrocitos (flechas blancas) y otros tipos celulares (flechas abiertas). También se pudo apreciar una reactividad perivascular no culear de GAB que no fue asociada a astrocitos (flecha roja).



**Figura (18). Localización nuclear de GAB en astrocitos localizados en el hipocampo de *rata*.** Inmunotinción detectada en el núcleo de células astrocitarias y otros tipos celulares mediante doble marcaje fluorescente con anticuerpos específicos en el hipocampo de rata. Se observó una tinción menos intensa para GAB en el citoplasma de astrogliá. **A)** Imagen panorámica en donde se observa en detalle mediante microscopía laser confocal, la localización de GAB en el núcleo de células astrocitarias (flechas blancas) y otros tipos celulares (flechas abiertas). **B)** Detalle de la marca nuclear en la fisura hipocampal. **C)** Astrocito perivascular (asteriscos) con reactividad nuclear para GAB, además, se observa reactividad positiva para células de origen endotelial (flecha roja). **D)** Imagen panorámica de la localización nuclear en astrocitos. Barra de escala: 50  $\mu$ m en todos los paneles.

#### **4.2.5.1 Localización de KGA en astrocitos de cerebro rata**

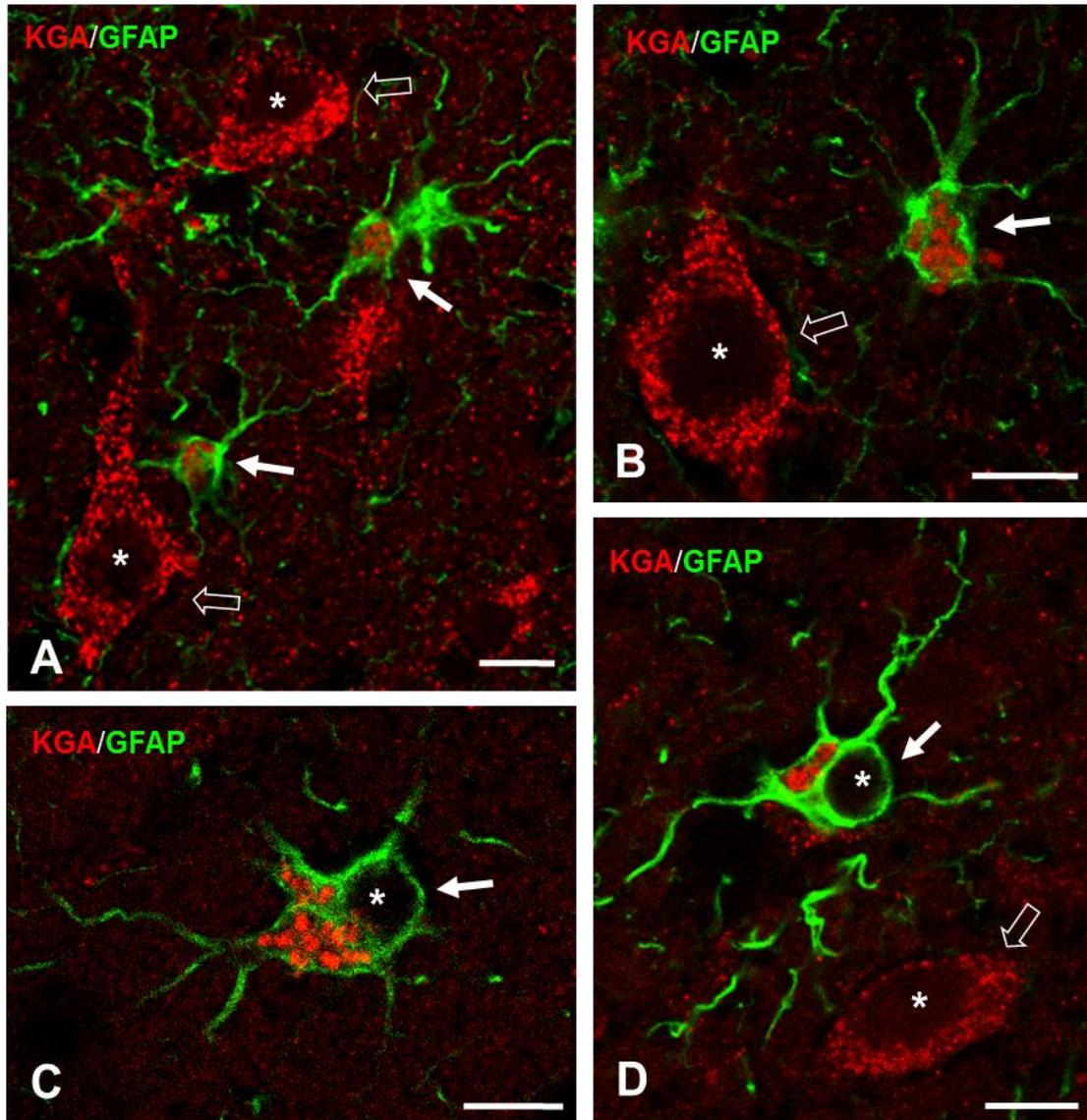
Mediante inmunocitoquímica a microscopía electrónica de transmisión en cerebro de rata, comprobamos la presencia de KGA en astrocitos (Fig. 19 A-D) y la confirmamos en neuronas (Fig. 19 G-H). El estudio ultraestructural en hipocampo de rata permitió observar una localización mitocondrial de esta proteína en células astrocitarias. En neuronas, la marca de KGA se concentró mayoritariamente también en mitocondrias. La abundancia del marcaje mitocondrial en astrocitos es mucho menor que en neuronas, concentrándose sólo en algunas mitocondrias. (Fig. 19 G). La técnica permite apreciar claramente el núcleo astrocitario (N) (Fig. 19 A) y un citoplasma poco electrodenso, en donde se puede observar la presencia de filamentos intermedios señalados con flechas negras (Fig. 19 B).



**Figura (19). KGA en astrocitos de cerebro de rata.** Inmunohistoquímica para KGA en el hipocampo de ratón a microscopía electrónica de transmisión. El marcaje para KGA se detectó en mitocondrias (flechas) de células astrogliales (A-F). C es un imagen a mayores aumentos de las mitocondrias inmunorreactivas presentes en el citoplasma del astrocito mostrado en A y en B. E y F son imágenes de mayor aumento de las mitocondrias que aparecen inmunopositivas en el astrocito de la imagen D. Los astrocitos son claramente identificables por su citoplasma poco electrodenso y la presencia de filamentos intermedios (flechas). Los asteriscos indican mitocondrias inmunonegativas para KGA. En G, se muestra el citoplasma de una neurona con numerosas mitocondrias marcadas con anti-KGA. H es un detalle de las mitocondrias KGA-positivas recuadradas en G. N, núcleo. Barras de escala, A, 2  $\mu\text{m}$ ; B y D, 1  $\mu\text{m}$ ; C, E, F y H, 0.5  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.5.2 Localización de KGA en astrocitos de cerebro humano**

Los anticuerpos anti-KGA empleados en esta memoria y desarrollados frente a la proteína KGA humana presentan reactividad cruzada con rata y ratón, tanto en inmunotransferencia Western como en ensayos inmunohistoquímicos. Sin embargo, con estos anticuerpos purificados no se detectó KGA en astrocitos de rata usando técnicas de revelado con DAB-Ni o inmunofluorescencia. Asumimos que el hecho de emplear anticuerpos frente a la proteína humana en tejido de rata, junto con la escasa abundancia de la proteína KGA en células gliales (comparado con la abundante expresión en neuronas), explicarían esta falta de inmunoreactividad. Por lo tanto, se procedió a la detección mediante dobles marcajes inmunofluorescentes en tejido humano postmortem, que permitieron apreciar una marca mitocondrial claramente particulada característica de esta tinción y abundante en somas y dendritas primarias de las neuronas de la corteza temporal (flechas abiertas). Se puede apreciar localización KGA de aspecto granular en astrocitos de la corteza temporal (flechas blancas) Figura 20 A, B y C.

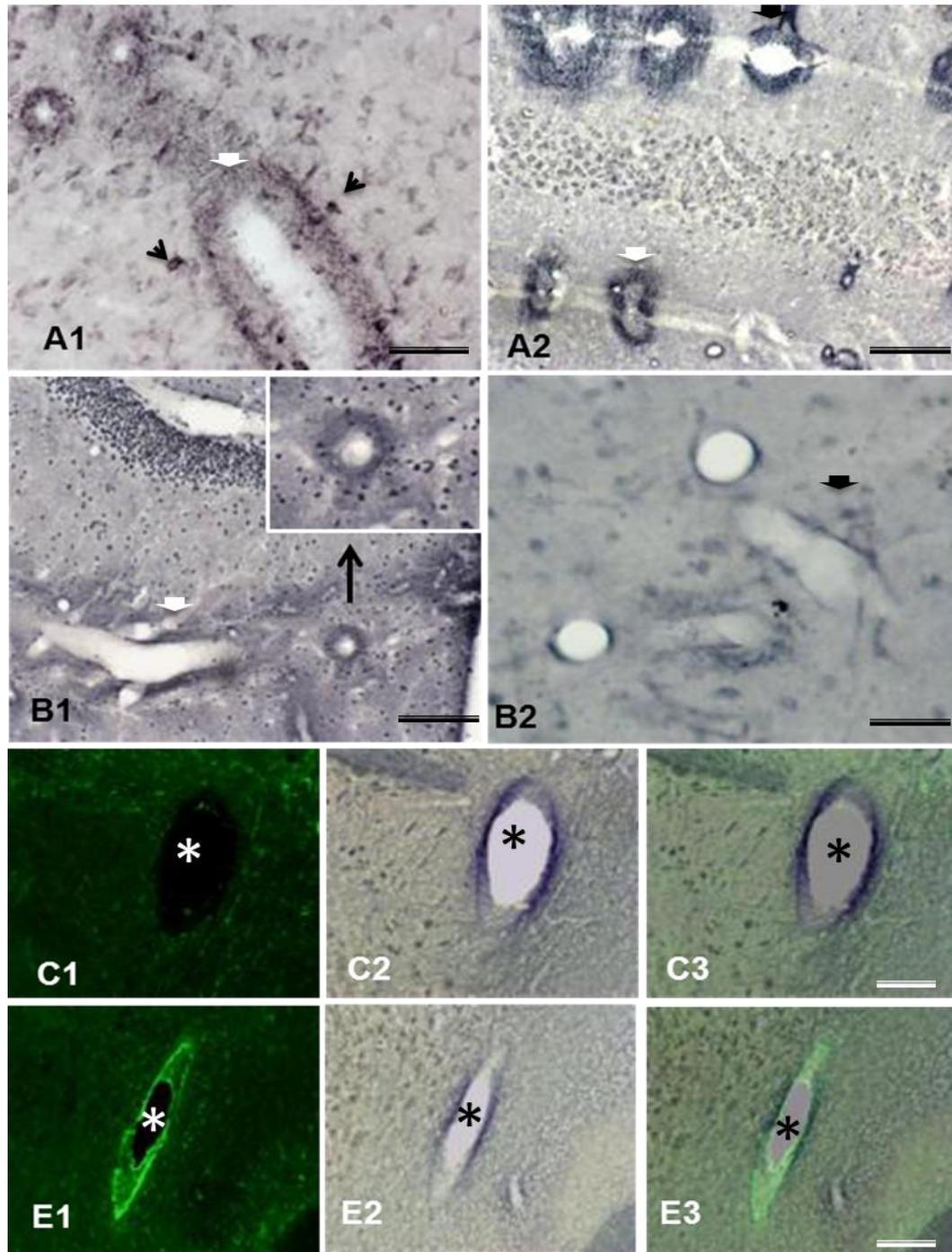


**Figura (20).** *KGA en astrocitos de cerebro humano empleando microscopía láser confocal.* Doble marcaje inmunofluorescente para la enzima KGA (rojo) y el marcador de astrocitos GFAP (verde) en secciones de cerebro humano postmortem (corteza temporal). La inmunotinción para KGA se detecta en el citoplasma de astrocitos (flechas blancas) y de neuronas (flechas abiertas) con un aspecto punteado. La inmunotinción para GFAP pone de manifiesto los filamentos intermedios característicos del citoplasma de células astrogiales. Los asteriscos indican la región del núcleo de astrocitos y neuronas. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

#### **4.3 Expresión de isoenzimas GA en cuerpos celulares y terminales nerviosos perivasculares**

En cerebro se pudo observar una inmunoreactividad para GA en estructuras perivasculares, alrededor de perfiles transversales o longitudinales de algunos vasos sanguíneos (Fig. 21 B). La morfología de estos vasos marcados en su periferia parece indicar que preferentemente corresponden a arteriolas. Esta inmunoreactividad GAB perivascular selectiva se caracterizó por la fuerte intensidad del marcaje de los núcleos celulares y de la banda concéntrica que delimita los terminales nerviosos. De igual forma, se encontró inmunoreactividad KGA perivascular a lo largo de todo el cerebro (Fig. 21 A). En este caso, la intensidad del marcaje fue mucho mayor que el marcaje perivascular de GAB, siendo visible a pocos aumentos como parches densos. Este marcaje aparece en forma de abundantes estructuras punteadas y cuerpos celulares (Fig. 21 A).

En este trabajo se ha detectado un marcaje nuclear de GAB en astrocitos localizados en la periferia del vaso (Fig. 21). El análisis de los cortes de cerebro posterior a la tinción histoquímica para la detección de la actividad enzimática GA, reveló también una clara actividad perivascular en algunos vasos sanguíneos (Fig. 21 C) no asociados a células astrocitarias, probablemente de origen endotelial y neuronal. En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, se había demostrado que la mayoría de estructuras con reactividad positiva a nivel perivascular de GAB y KGA, no pertenecían a astrocitos (Olalla, 2002). Los marcajes realizados con anticuerpos GAB desarrollados en rata, pusieron de manifiesto, además de la tinción característica a nivel de núcleos celulares, una reactividad positiva probablemente de células gliales asociadas a vaso sanguíneo (Figura 21 B2).



**Figura (21): Detalle de la presencia de proteína GA y actividad enzimática GA en estructuras perivasculares.** A) Inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para KGA en cerebelo de rata. Las flechas blancas muestran la reactividad punteada en la periferia del vaso y somas celulares (flechas negras). B) Inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para GAB en hipocampo. B1) Policlonal de conejo: se aprecia la imagen ampliada de un vaso reactivo. B2) Policlonal de rata: se observó una reactividad diferencial tanto a nivel nuclear y no nuclear en la periferia del vaso (flecha negra). C) Actividad GA perivascular (asteriscos) en corteza. E) Localización de la actividad GA perivascular con GFAP en corteza de rata. Barra de escala: A-B) 50  $\mu$ m; C-E) 100 $\mu$ m.

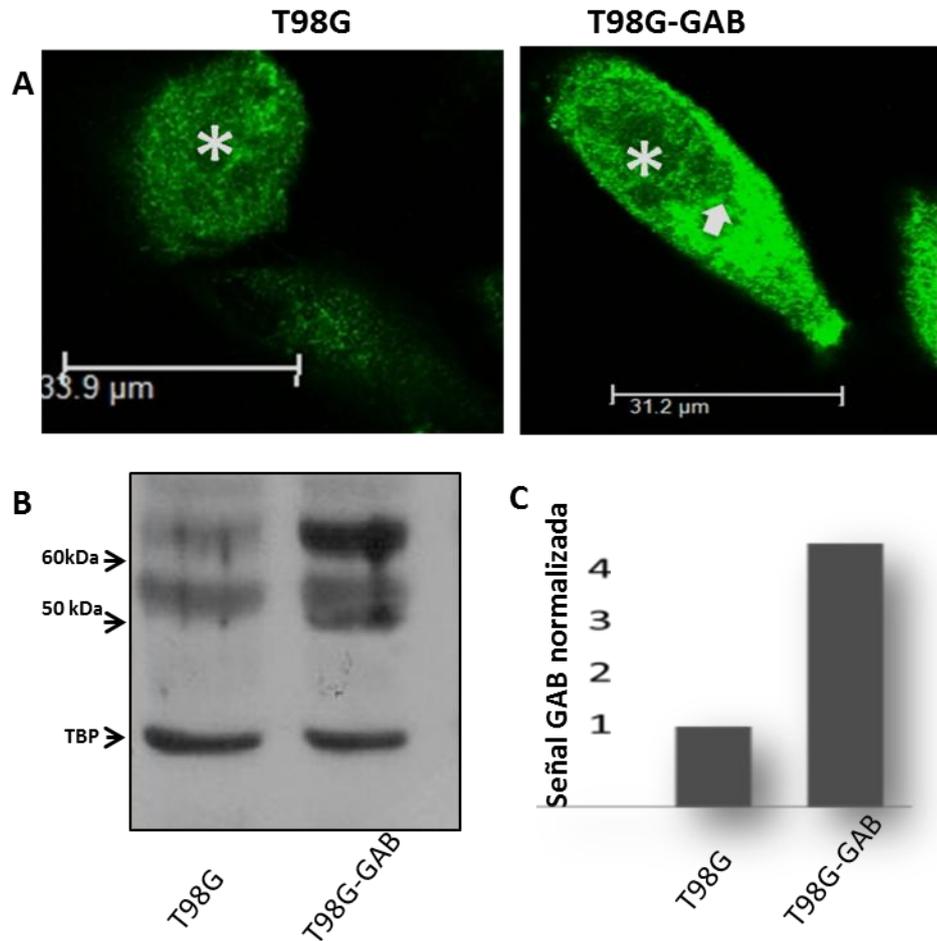
#### **4.4 Expresión nuclear de GAB en líneas tumorales humanas**

Como se ha indicado con anterioridad, la GA era tradicionalmente considerada como una enzima mitocondrial (Curthoys y Watford, 1995) si bien, nuestro grupo reportó la presencia de GAB en el núcleo de cerebro de mamíferos (Olalla *et al.*, 2002). Con el fin de encontrar un modelo experimental que nos permitiera estudiar y caracterizar la función de GAB en el núcleo y los procesos moleculares que regulan el tráfico de esta proteína hacia este compartimento celular, decidimos estudiar la localización subnuclear de GAB en líneas de cáncer humano y, para ello, procedimos a la realización de inmunocitoquímica de células en cultivo y al fraccionamiento subcelular, seguido de inmunotransferencia Western.

##### **4.4.1 Expresión nuclear de GAB en células de glioblastoma humano T98G y T98G-GAB**

Un modelo celular de glioblastoma humano, T98G, que sobreexpresa el gen *GLS2* mostró un cambio global del transcriptoma hacia un fenotipo menos maligno y más diferenciado (Szeliga *et al.*, 2008). Por lo tanto, asumimos que la cepa parental T98G y la línea celular T98G-GAB, que sobreexpresa *GLS2*, constituirán un modelo válido donde estudiar el importe y la localización nuclear de estas isoenzimas.

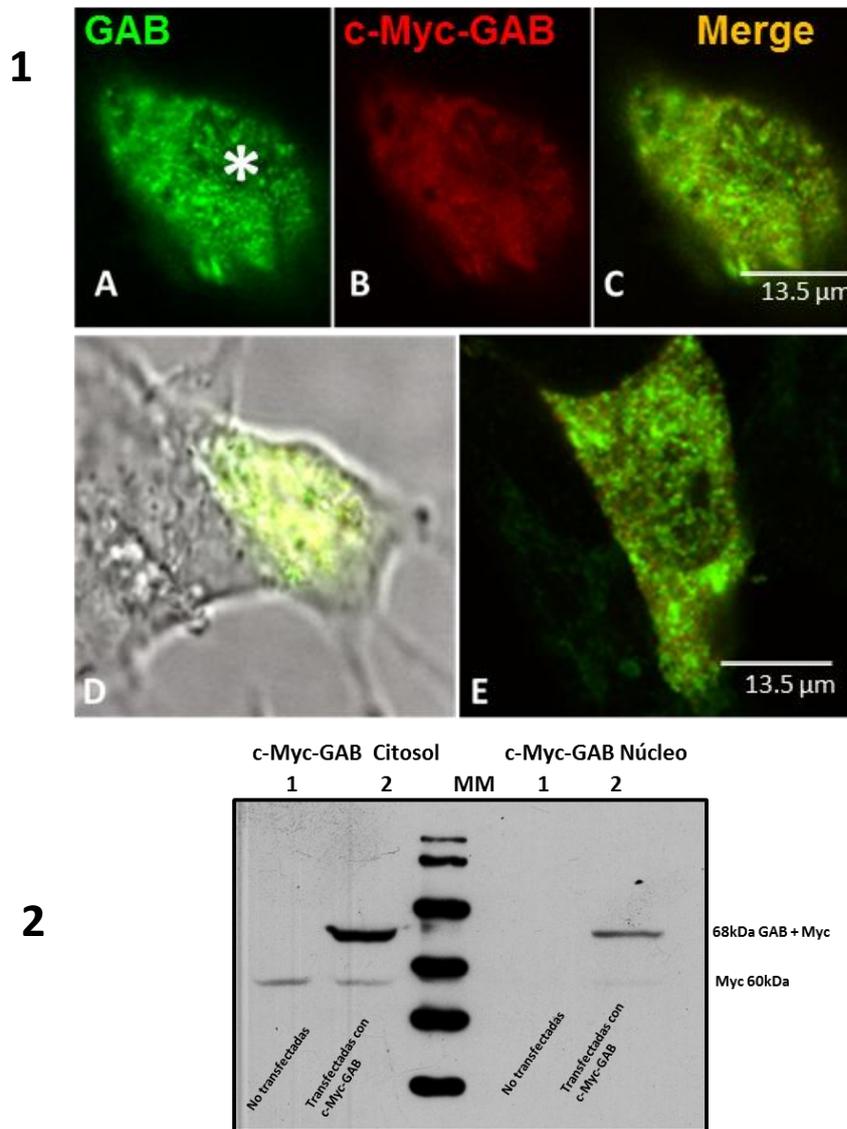
En los estudios de inmunofluorescencia se pudo apreciar una reactividad *GLS2* positiva en ambos tipos celulares, siendo el marcaje más prominente en el núcleo de células que sobreexpresan GAB (T98G-GAB). Asimismo, se observó un fuerte marcaje citosólico asociado a un anillo perinuclear, de aspecto granular (Fig. 22 A). El aumento de GAB en núcleo de las células que sobreexpresan *GLS2*, fue confirmado mediante inmunotransferencia Western de fracciones nucleares (Fig. 22 B-C). Es importante resaltar que para poder obtener muestras comparables, se lanzaron cultivos con el mismo número de células por placa y se recogieron en fase de crecimiento exponencial, 24 horas después de la siembra.



**Figura (22). Inmunocitoquímica e inmunotransferencia Western para T98G y T98G-GAB. A)** La sobreexpresión de GAB en gliomas malignos se induce claramente en citosol y en el núcleo de células T98G-GAB que sobreexpresan Gls2. Se observa la formación de un anillo perinuclear (flecha blanca) reactivo y una redistribución de la proteína en el núcleo (asterisco) y en el citosol. **B)** SDS-PAGE e inmunotransferencia Western para extractos nucleares de T98G y T98G-GAB, revelado frente a anti-GAB purificado y anti-TATA-binding protein (TBP), utilizado como control de carga de proteínas nucleares. **C)** Análisis densitométrico de las bandas de GAB normalizadas frente a su control de carga TBP.

#### **4.4.2 Localización nuclear de GAB en células de neuroblastoma SHSY-5Y**

La localización de GAB en el núcleo de células de glioblastoma T98G y en las células T98G-GAB que sobreexpresan *GLS2*, se detectó empleando inmunocitoquímica con anticuerpos frente a la isoenzima humana GAB. Para confirmar la localización nuclear de GAB, quisimos emplear una metodología ortogonal que no depende de los anticuerpos anti-GAB. Por lo tanto, realizamos construcciones con el marco abierto de lectura de GAB fusionado en su extremo N-terminal con el epítipo c-Myc. La inmunocitoquímica de células transfectadas con la construcción pCMV-Myc-N-GAB, demostró una clara sobreexpresión de la proteína GAB tanto en núcleo como en citoplasma celular (Fig. 23).

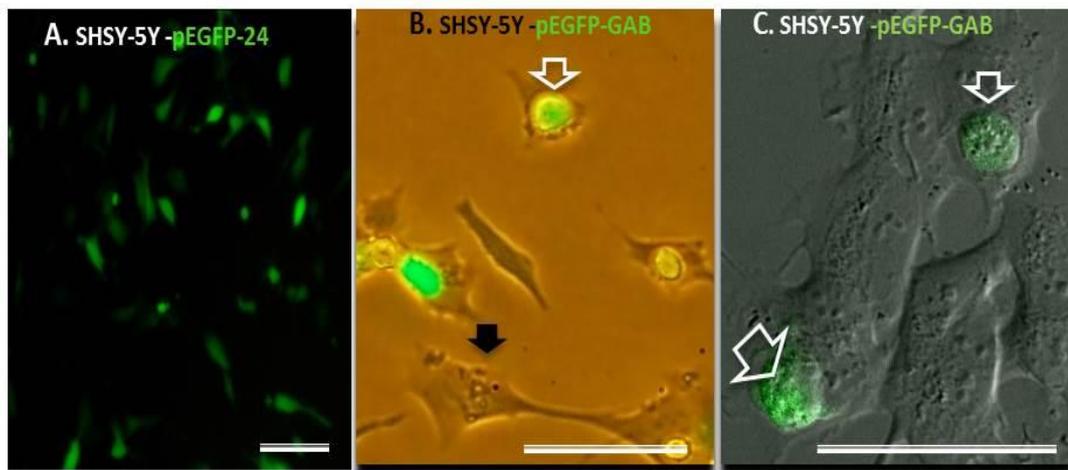


**Figura (23). Inmunocitoquímica en células SHSY5Y transfectadas con un vector de expresión MYC-GAB. 1A)** GAB (verde); **1B)** MYC (rojo); **1C)** localización MYC-GAB; **1D)** Imagen a campo claro y detalle de la localización en núcleo celular, **1E)** Ampliación de la sobreexpresión de MYC-GAB en el citoplasma y núcleo celular, GAB (verde). MYC (rojo). Los niveles endógenos de GAB se observan en células no transfectadas (flecha blanca). El panel inferior **(2)** muestra la inmunotransferencia Western de las fracciones citosólicas y nucleares de células transfectadas con c-MYC-GAB (calle 2, 30  $\mu$ g en ambas fracciones) y sus respectivos controles células no transfectadas (calles 1, 30  $\mu$ g en ambas fracciones), ambos reveladas con anticuerpos anti-Myc. Barra de escala: 13.5  $\mu$ m.

Se observó una clara sobreexpresión en la fracción citosólica y la fracción nuclear (no tan intensa) de la proteína de fusión c-Myc-GAB con una masa molecular aproximada de 68 kDa. Las bandas inferiores se corresponden con la proteína c-Myc endógena a una masa molecular aproximada de 60 kDa. Las diferencias en la intensidad de las bandas de la fracción nuclear (menos intensas) con respecto a la fracción citosólica, indican una clara diferencia en la

abundancia relativa de estas proteínas, y están de acuerdo con los resultados de inmunocitoquímica.

Se utilizaron también transfecciones transitorias (48 h) de esta línea celular con una construcción que contiene la secuencia codificante de la isoenzima GAB fusionada a la proteína verde fluorescente EGFP en su extremo C-terminal (pEGFP-GAB) (materiales y métodos, apartado 3.3.4). La expresión de la proteína de fusión fluorescente se confirmó mediante su observación por excitación con luz UV, en un microscopio de fluorescencia (Fig. 24). Se usó como control de la transfección la construcción pEGFP-24, que contiene una secuencia no codificante (600 pb) de un tamaño similar a la construcción que contiene la secuencia codificante de la GAB humana (Fig. 24 A). Aunque la eficacia de la transfección no fue elevada, se puede observar una marca nuclear de la proteína de fusión EGFP-GAB.



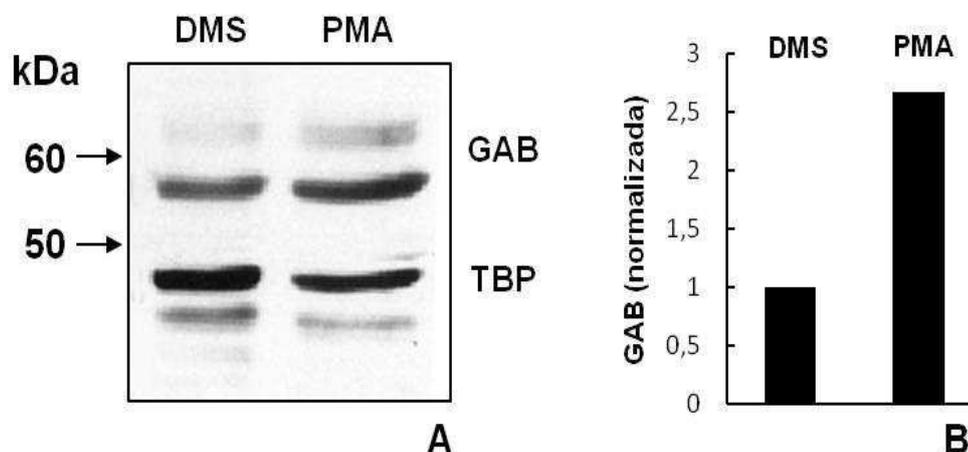
**Figura (24). Localización nuclear de las proteínas GAB ectópica expresadas en células de neuroblastoma SHSY-5Y.** Las células SHSY-5Y transfectadas con la construcción EGFP-GAB fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia (A, B y C). En el panel B, se detalla la marca nuclear de GAB en células transfectadas (flechas blancas) y la ausencia de fluorescencia en no transfectadas (flecha negra). La construcción de pEGFP-24 que expresa una proteína de fusión de tamaño similar a EGFP-GAB, fue empleado como control de la transfección (A). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

En estudios previos con células de cáncer humano, demostramos que las proteínas codificadas por *GLS2* podrían estar asociadas con diferenciación celular o con un estado de quiescencia, no proliferativo, mientras que aquellas codificadas por el gen *GLS* lo están con el crecimiento y la proliferación celular

(Pérez-Gómez *et al.*, 2005). Partiendo de estos resultados y de la confirmación de la localización nuclear de GAB en líneas de cáncer humano, quisimos determinar si el PMA (agente inductor de diferenciación celular) puede intervenir en el importe de la isoenzima GAB al núcleo celular.

#### 4.5 Efecto de los ésteres de forbol (PMA) en la expresión nuclear de GAB en células SHSY-5Y y hepG2.

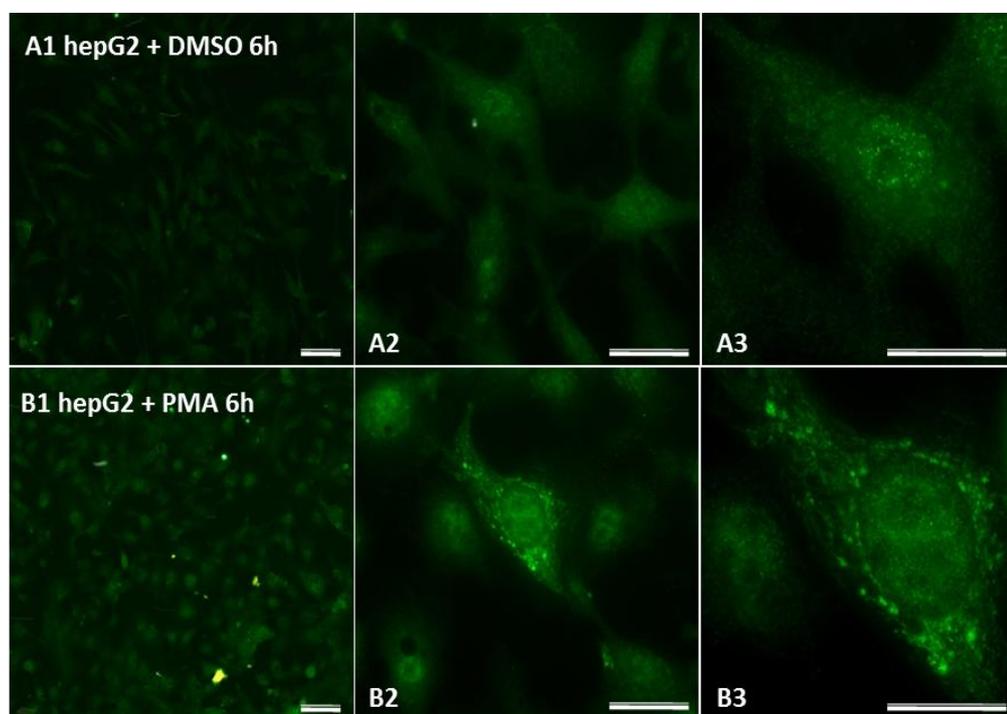
El éster de forbol PMA ocasiona parada de crecimiento, división celular y la aparición de neuritas en la línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y, fomentando la diferenciación sobre la proliferación (Soderholm *et al.*, 2000). El PMA también induce diferenciación en células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano (Wen-Sheng, 2006). Dado el potencial papel de las isoenzimas GIs2 en la diferenciación celular, quisimos comprobar si el tratamiento de células tumorales con el agente de diferenciación PMA aumentaba la expresión de GAB en el núcleo de estas células. Para ello, se aislaron núcleos celulares tras la incubación de las células con PMA.



**Figura (25). Inmunotransferencia Western para GAB de extractos nucleares de células SHSY-5Y incubadas 6h con PMA. A:** las células tumorales se incubaron con 1  $\mu$ M de PMA durante 6h, tras lo cual se aislaron los respectivos extractos nucleares que se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia Western revelada con anti-GAB y con anti-TBP, empleada como marcador nuclear y control de carga. **B:** análisis densitométrico de las bandas de GAB obtenidas y normalizadas frente al control de carga TBP; dimetilsulfóxido (DMS), control incubado sólo con dimetilsulfóxido; PMA: células incubadas con PMA.

Como se observa en la Figura 25, las células SHSY-5Y tratadas con PMA incrementan la cantidad de GAB en la fracción nuclear en relación con las células control (tratadas únicamente con el vehículo DMS). Se observó un incremento de casi 3 veces en la intensidad de la señal de la fracción nuclear (normalizada frente a la intensidad de la señal del control de carga TBP) de células tratadas con respecto a las células control.

La microscopía de fluorescencia corroboró estos resultados en células HepG2, y añadió el dato de que GAB mitocondrial también incrementó en citosol con respecto a las células control, debido al tratamiento con el agente de diferenciación (Fig. 26).



**Figura (26). Inmunofluorescencia GAB en células HepG2 tratadas con PMA.** Las células se trataron 24 horas después de la siembra y en fase de crecimiento exponencial. A (1-3) Policlonal de conejo anti-GAB en células control tratadas con DMS utilizado como disolvente para el PMA B (1-3) Policlonal de conejo anti-GAB en células incubadas con PMA, 2 horas, 24 horas después de la siembra. Barra de escala: (A1-B1) 30 $\mu$ m; (B2-3, A2-3) 30  $\mu$ m (ampliada).

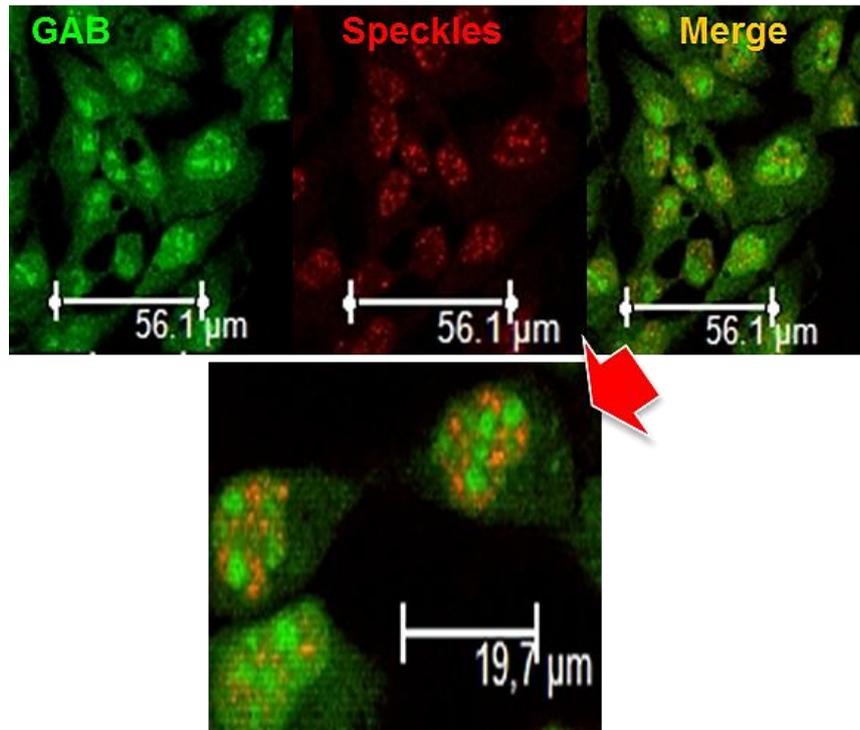
Curiosamente, se observó una asociación de estructuras GAB inmunopositivas a nivel perinuclear en algunas células tratadas (B2), de aspecto granular, acompañado de un evidente cambio en la morfología celular (B2) (Wilson *et al.*, 1997). Además, se observó una redistribución espacial de la proteína que en su mayoría se concentró en el núcleo (B1-3).

#### **4. 6 Localización subnuclear de GAB en células de cáncer humano**

Para profundizar sobre la localización nuclear de GAB y poder asociar su expresión a alguna función fisiológica específica, decidimos en una segunda instancia, estudiar la localización subnuclear de GAB en células tumorales. Para ello, seleccionamos anticuerpos que se unen a proteínas localizadas en diferentes orgánulos subnucleares (véase materiales y métodos, apartado 3.4.17.2).

##### **4.6.1. Isoenzima GAB y nuclear speckles**

Los *nuclear speckles* son agrupaciones granulares de intercromatina, dominios nucleares enriquecidos con mRNA premaduro localizados en el nucleoplasma de las células de mamífero (Lamond y Spector, 2003). Son estructuras dinámicas y sus componentes pueden intercambiarse continuamente entre el nucleoplasma y localizaciones nucleares, incluyendo sitios de transcripción activos.



**Figura (27).** Doble marcaje inmunofluorescente con SC35 (phospho) antibody-Nuclear Speckle Marker y GAB en células HepG2. Se observó por microscopia laser confocal reactividad para ambos anticuerpos en el núcleo. GAB se encontró dispersa y formando agregados proteicos en el nucleoplasma celular. No se observó una clara colocalización de ambos antígenos en el núcleo. La apariencia granular del marcaje con anticuerpos GAB sugiere una localización en región nucleolar.

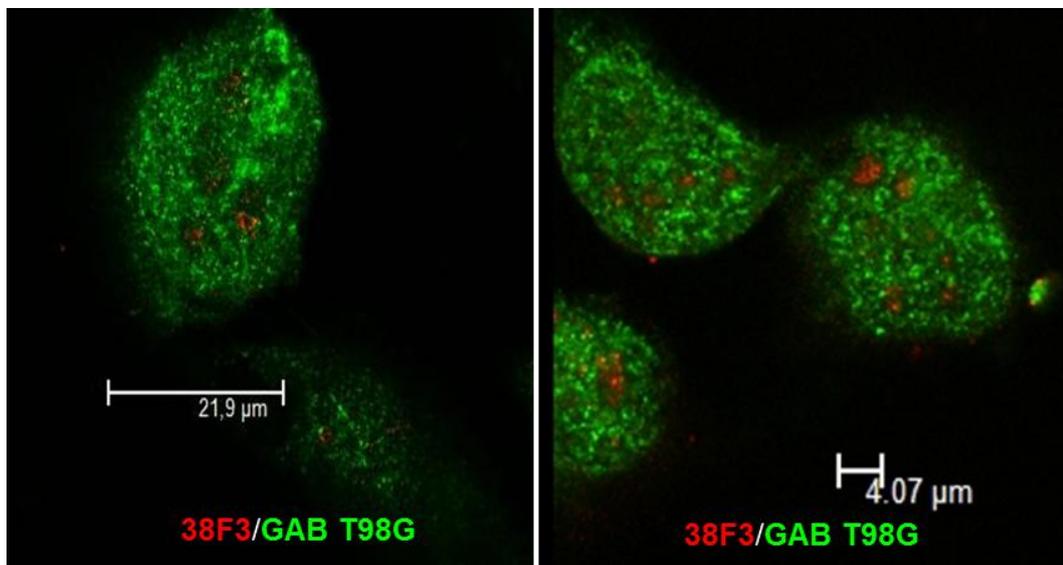
Se pensó que GAB podría asociarse a los nuclear speckle en células tumorales porque en estudios preliminares mediante inmunocitoquímica (Rubio-López dela Oliva, 2012) habíamos observado una marca nuclear de GAB en agrupaciones discretas que semejaban las de los nuclear speckles.

Las imágenes al microscopio de fluorescencia se tomaron de forma secuencial empleando células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. La apariencia de GAB en el núcleo de HepG2, sugiere que la proteína se concentra por lo menos en este tipo celular en concreto, en lo que podría ser una región nucleolar. La distribución en el nucleoplasma de GAB, a diferencia de su localización grumosa, no permite distinguir una colocalización con estas poblaciones discretas de pre-mRNA.

#### 4.6.2. Localización subnuclear de GAB en nucleolo

Otro de los orgánulos subnucleares que quisimos comprobar como posible localización de GAB en núcleo fue el nucléolo, para el que existen marcadores muy establecidos como la fibrilarina.

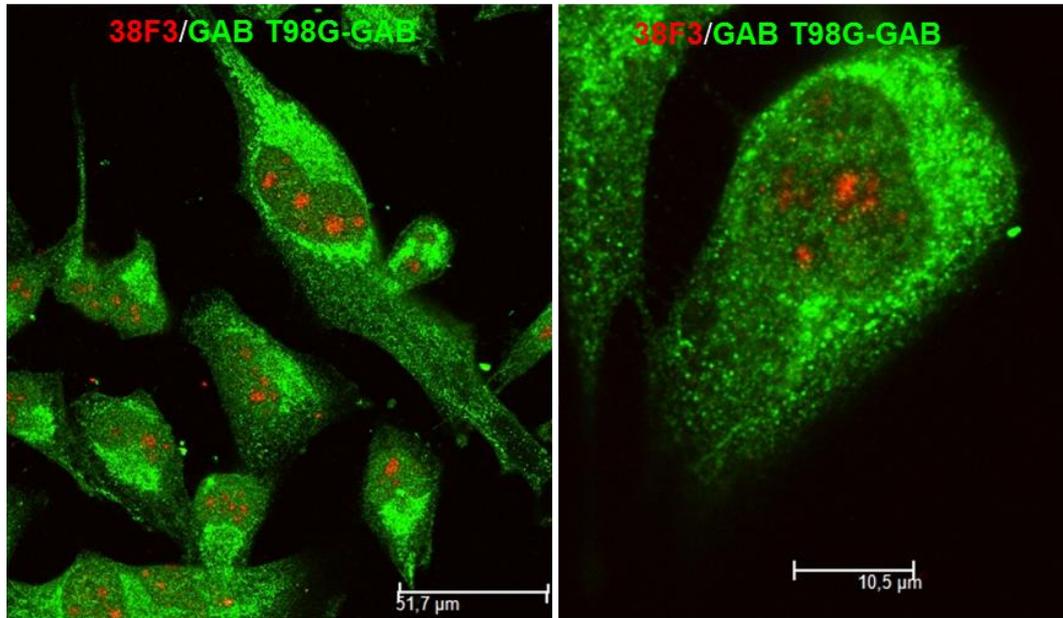
La fibrilarina, así denominada por su citolocalización en el componente fibrilar denso y en el centro fibrilar del nucleolo, también llamada *rRNA 2'-O-methyl transferase*, es una enzima que en humanos es codificada por el gen FBL (ID: P22087), revisado en la base de datos *UniProtKB/Swiss-Prot*), y es un componente de pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) que se cree que participan en el primer paso de la biogénesis ribosomal. En el procesamiento del pre-(rRNA) ribosomal utiliza el dador de metilo S-adenosil-L-metionina para catalizar la metilación del sitio específico 2-hidroxilo de la ribosa en el RNA pre-ribosomal. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos anti-GAB y Fibrilarina.



**Figura (28).** Doble marcaje inmunofluorescente con GAB (verde) y Fibrilarina (rojo) en células T98G. Se observó en este tipo celular que el marcaje es más generalizado y uniforme en núcleo; de igual forma, no se observó un componente fibrilar denso claramente marcado.

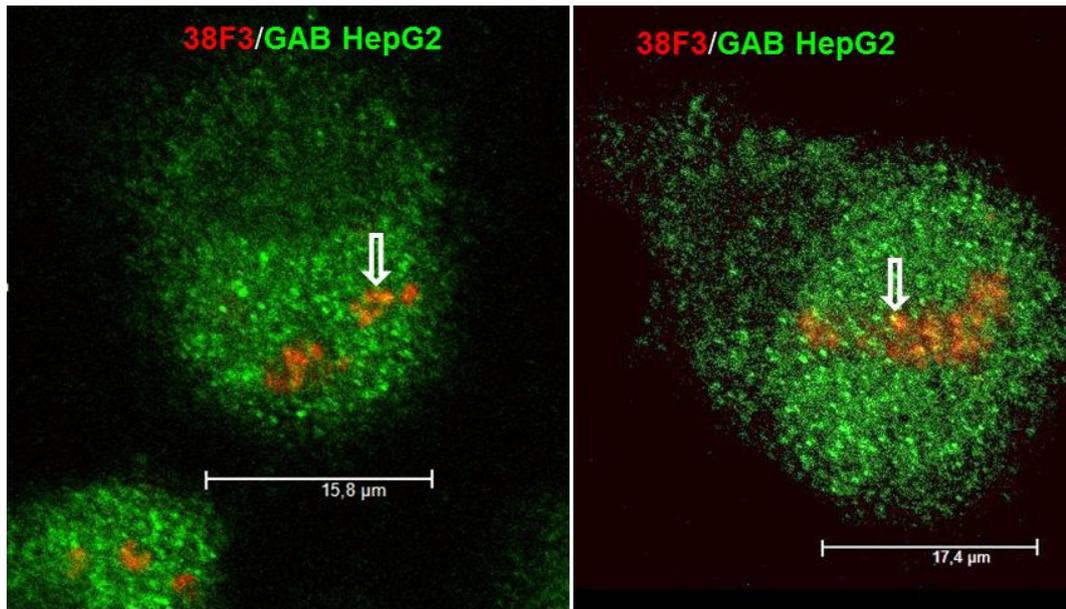
Debido a que GAB se encuentra dispersa en el nucleoplasma, no podemos afirmar con certeza que el marcaje particulado no colocaliza con 38F3. Podemos apreciar en células no transfectadas una tinción densa en algunas células a nivel

perinuclear, probablemente mitocondrial (resultados no mostrados). Por lo que resulta evidente que la expresión de GAB no está confinada o limitada al nucléolo, como ocurre en el caso de fibrilarina.



**Figura (29).** Doble marcaje inmunofluorescente con GAB (verde) y Fibrilarin en células T98G-GAB. Se observó en este tipo celular que el marcaje con anti GAB es más generalizado y uniforme en citoplasma y núcleo, no se observó un componente fibrilar denso del nucleolo claramente marcado con GAB como en las HepG2. Las células transfectadas presentan un aumento en la intensidad de la fluorescencia con respecto a las T98G.

Quisimos también resaltar que se observa una fuerte reactividad para GAB en el citoplasma de las células transfectadas, el marcaje granular y perinuclear es consistente en casi la mayoría de las células observadas. También se puede apreciar un cambio morfológico de la célula que podría ser consecuencia de la diferenciación inducida por la sobreexpresión de GAB. El patrón de expresión de 38F3, fue siempre constante en todas las células analizadas. Difícilmente podemos descartar la posibilidad de que ambos antígenos se localicen en el mismo espacio dentro del núcleo celular ya que GAB se encuentra dispersa en el nucleoplasma.

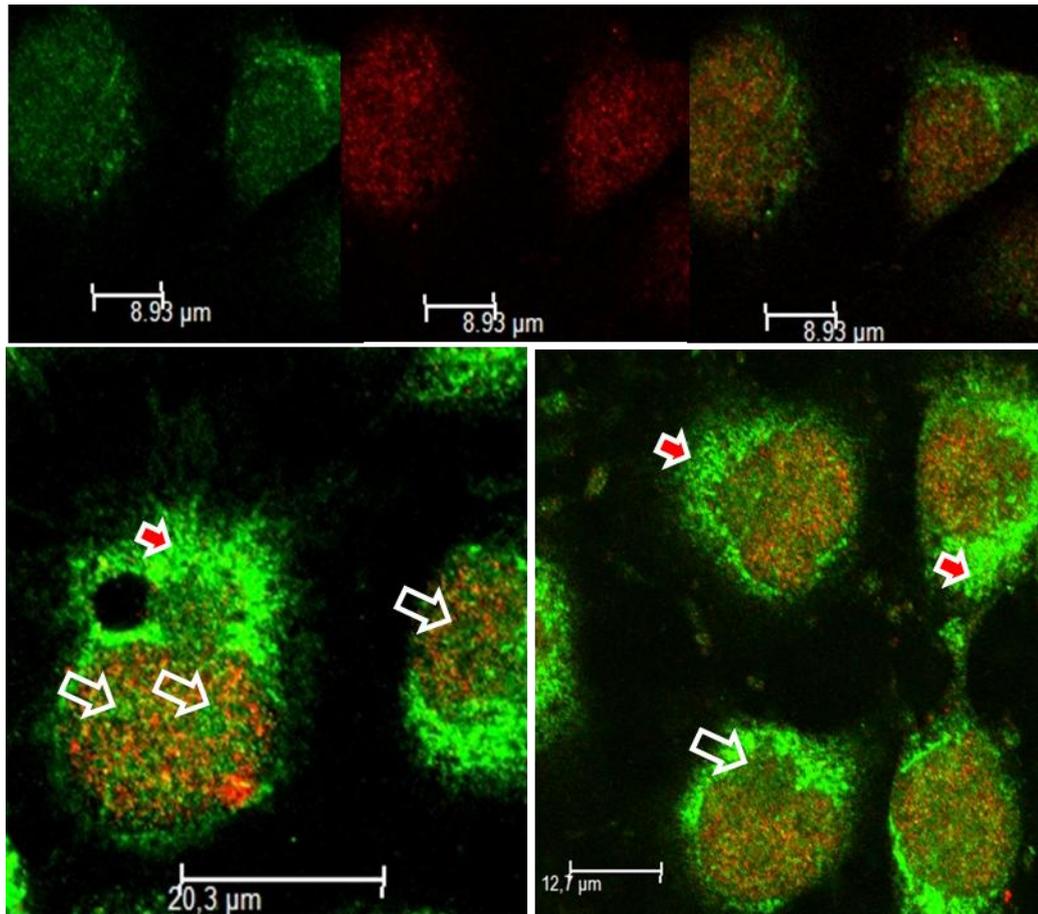


**Figura (30).** Doble marcaje inmunofluorescente con GAB (verde) y Fibrilarina (rojo) en células HepG2. Se observó un patrón de distribución uniforme en todo el nucleoplasma celular, muy diferente al observado en T98G-GAB.

A diferencia de las células T98G y T98G-GAB, la inmunoreactividad de GAB en células HepG2 es más uniforme. No se observan estructuras densas granulares asociadas a la región perinuclear. Se observan puntos amarillos como resultado de la colocalización de ambas marcas (flechas). El patrón de expresión claramente indica que GAB se expande a lo largo del compartimento nuclear.

#### **4.6.3 Localización subnuclear de GAB en nucleoplasma**

Partiendo de estos resultados previos y de la imposibilidad de asociar a regiones concretas del núcleo a la isoenzima GAB, procedimos a realizar dobles marcajes con anticuerpos anti-GAB desarrollado en rata (diferente al utilizado en los estudios anteriores) y un anticuerpo con un patrón similar de expresión como anti JMJD5. Esto últimos, reconocen a una enzima implicada en procesos de desmetilación de histonas JMJD5 (factor de transcripción putativo de histonas desmetilasas).



**Figura (31). Inmunocitoquímica fluorescente en HepG2.** Detalle del marcaje perinuclear de GAB (verde) y nuclear de JMJD5 (rojo). Se observa una distribución uniforme y una clara localización de ambas proteínas en el nucleoplasma celular. En la parte superior se puede apreciar el marcaje nuclear carente de estructuras perinucleares. No obstante observamos que la mayoría de las células presentan reactividad perinuclear probablemente mitocondrial (flechas rojas). Las flechas blancas señalan áreas en donde parece estar condensada la marca de GAB dentro del núcleo (B1-2).

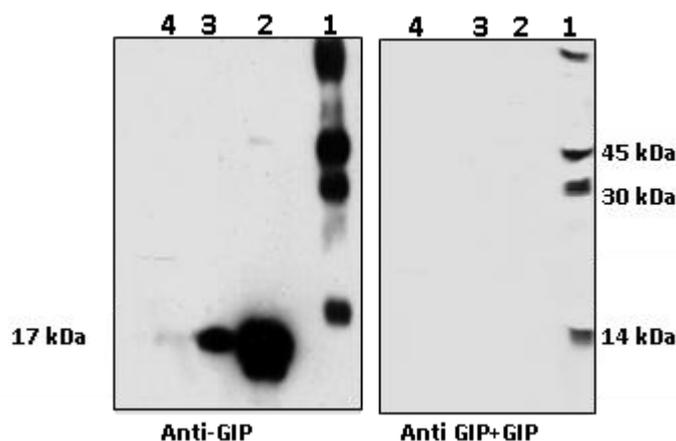
Las imágenes claramente nos permiten apreciar la distribución espacial de ambos antígenos a lo largo del nucleoplasma de células HepG2. También, se puede apreciar una localización mitocondrial para GAB a nivel perinuclear que fue mucho más intensa que el marcaje nuclear. Aunque la mayor parte de la marca granular de ambos antígenos colocaliza en el núcleo, se puede apreciar zonas inmunorreactivas para GAB que no parecen colocalizar con el marcador para proteínas JMJD5 (flechas blancas).

#### 4.7 Búsqueda, identificación y validación de proteínas nucleares que interactúan con GIP mediante métodos proteómicos

Antes de realizar el rastreo de proteínas nucleares que interactúan con GIP, pusimos a punto los anticuerpos policlonales específicos para la proteína recombinante GIP humana, con los que realizamos estudios previos de localización nuclear de esta proteína PDZ.

##### 4.7.1 Validación de anticuerpos purificados (anti-GIP)

Una vez obtenidos y purificados los anticuerpos, se procedió a evaluar su especificidad mediante inmunotransferencias Western empleando proteína recombinante humana como control positivo y extractos de cerebro de rata.



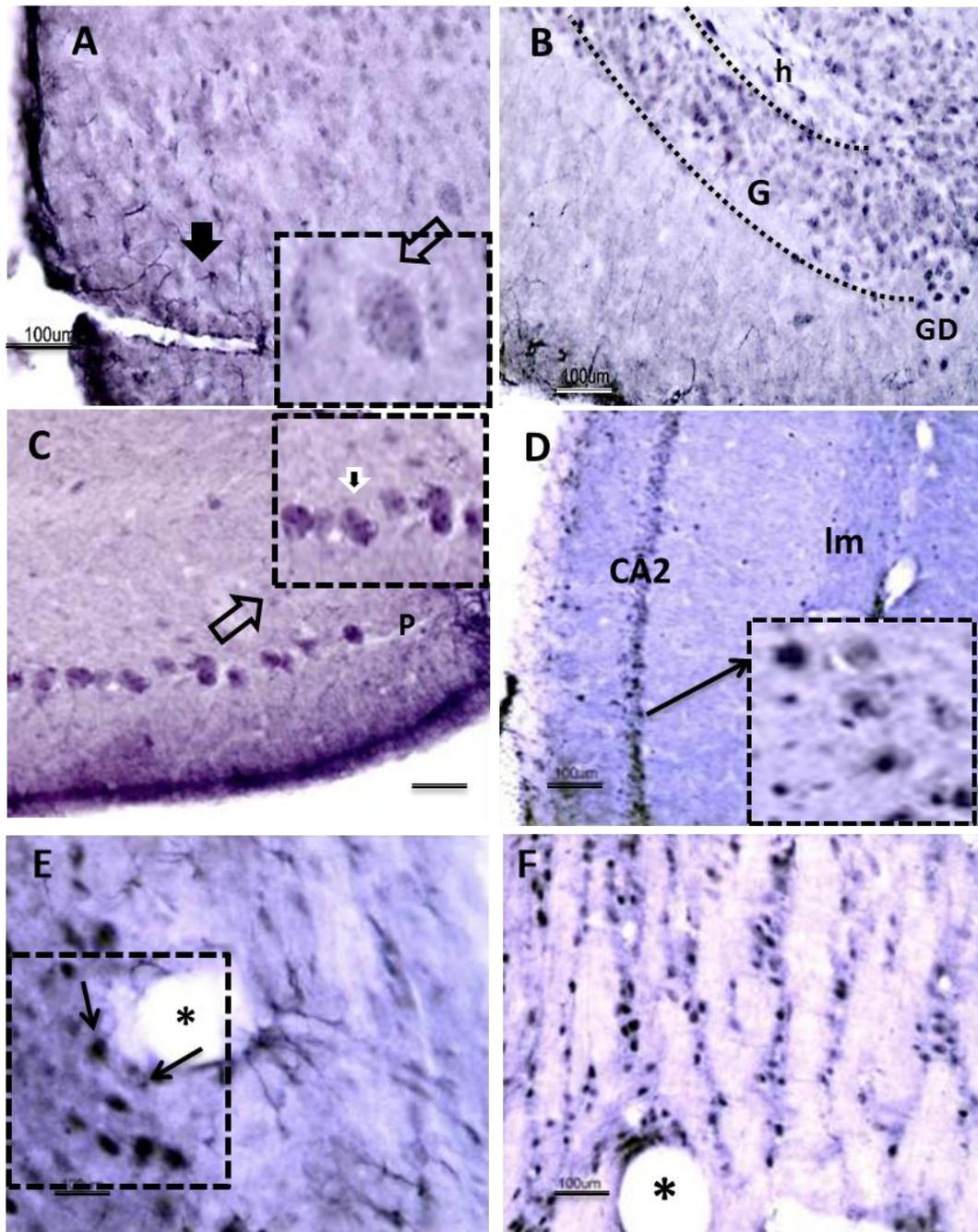
**Figura (32). Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales de conejo anti-GIP:** policlonal de conejo anti-GIP 1:250. Calle 1, *magicmark*, calle 2, GIP recombinante (20 ng); calle 3, extracto total de cerebro de rata (40 µg); calle 4, extracto nuclear de cerebro de rata (20 µg). El anticuerpo se incubó frente a su respectivo antígeno dando lugar a la ausencia de las bandas.

La especificidad quedó patente al desaparecer la señal inmunoreactiva de GIP tras preadsorber el antígeno frente al anticuerpo (Fig. 32). En cambio, una clara señal fue observada a la masa molecular esperada (~16 kDa) utilizando GIP humana recombinante o extracto total de cerebro de rata. De igual forma, La preadsorción de estos anticuerpos y su posterior incubación en secciones de cerebro de rata, dio lugar a la ausencia de inmunoreactividad en todas las regiones analizadas.

#### 4.7.2 Localización de la proteína GIP en cerebro de rata

Como trabajo complementario a los experimentos para aislar proteínas nucleares que interactúan con GIP y con el objetivo de comprobar una localización nuclear de esta proteína, realizamos inmunohistoquímica en cerebro de rata con anticuerpos isoenzima específicos anti-GIP. La proteína se localizó a lo largo de toda la extensión rostrocaudal del cerebro de rata. La inmunotinción se observó tanto en neuronas como en células gliales de aspecto astrocitario en todas las áreas analizadas (Fig. 33). Con estos nuevos anticuerpos se pudo además distinguir una reactividad nuclear en todas las regiones cerebrales (Fig. 33 E, C y F).

A nivel de la corteza cerebral de rata, esta proteína PDZ fue expresada fundamentalmente por astrocitos localizados en todas las capas corticales y neuronas (Fig. 33 A). La inmunotinción en neuronas se concentró en el citoplasma, que probablemente reflejaba una localización mitocondrial y no mitocondrial, previamente descrita (Olalla *et al.*, 2008). A nivel del hipocampo, se observaron numerosos astrocitos inmunorreactivos en todas las regiones que constituyen el asta de Ammon y el giro dentado (Fig. 33 B-C). En el estriado también se detectaron numerosos núcleos inmunomarcados (Fig. 33 E-F) distribuidos por toda la extensión rostrocaudal del núcleo caudado-putamen y células astrocitarias reactivas alrededor del vaso (Fig. 33 F). En el cerebelo, se observó una fuerte tinción en la capa molecular, donde se localizan las dendritas de las células de Purkinje, y las células de Purkinje propiamente, aparecen fuertemente teñidas (Fig. 33 D), además se observó inmunoreactividad en la capa granular y molecular. Se ha descrito previamente la localización de ésta proteína en astrocitos y neuronas de cerebro de rata, con una distribución celular mitocondrial, citosólica y asociada a la envoltura nuclear (Olalla *et al.*, 2008).

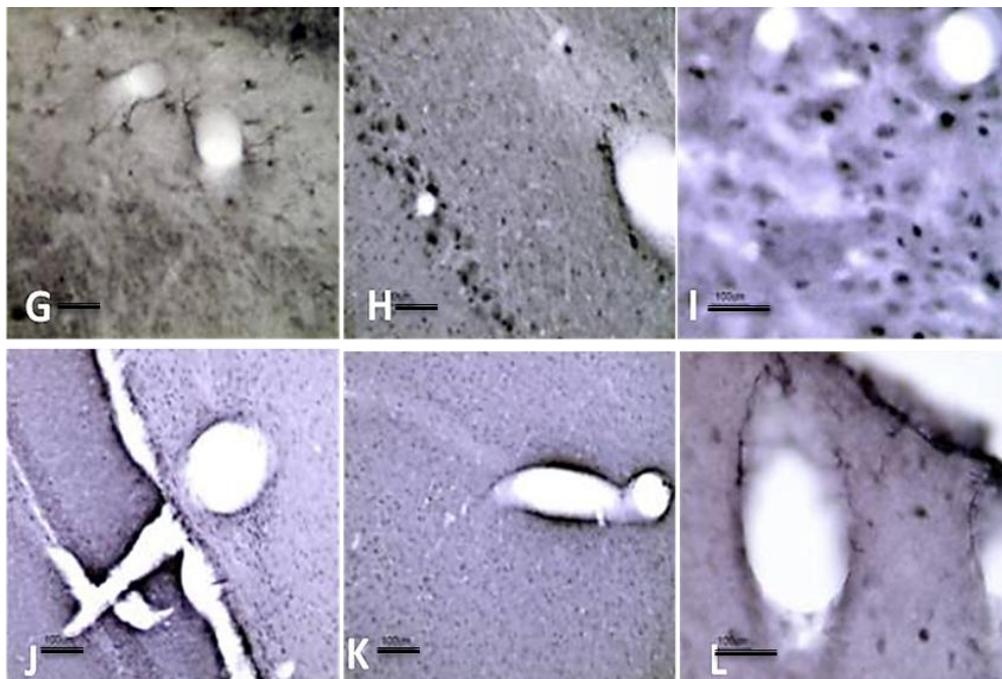


**Figura (33). Localización regional de GIP en cerebro de rata.** **A)** Reactividad positiva para lo que parecen ser células gliales corticales (flecha negra) y neuronas. Detalle de la apariencia granular neuronal probablemente mitocondrial (imagen recuadrada). **B)** Imagen ampliada de la marca nuclear del giro dentado. **C)** Intenso marcaje en cerebelo de rata, detalle de la presencia de GIP en células de Purkinje (imagen recuadrada). **D)** Reactividad en el hipocampo. CA2 flecha (imagen recuadrada). **E)** Astrocitos estriatales inmunorreactivos y detalle de algunos vasos con aferencias gliales. Se observan núcleos periféricos de otros tipos celulares (flechas negras). **F)** Marcaje nuclear en células estriatales. CA2, capa piramidal del hipocampo; M, capa molecular; P, células de Purkinje; h, hilus; GD, giro dentado; G granular del GD; Im, subcampo lacunoso molecular. Barra de escala: 100µm.

#### 4.7.3 Localización perivascular de GIP en cerebro de rata

Aunque nuestro objetivo principal es demostrar la existencia de una localización nuclear y el aislamiento de proteínas que se asocian a GIP en éste orgánulo, centramos también la atención en el hecho de que ambas proteínas GAB y GIP, colocalizan en pies perivascuales astrocitarios y, en la abundante expresión de GIP en estas estructuras, ya que hay claras evidencias de que una actividad glutamatergica puede contribuir en gran medida a un control vasomotor selectivo (Rancillac *et al.*, 2006) en donde la interacción GIP-GAB podría ser un condicionamiento clave en dicho proceso.

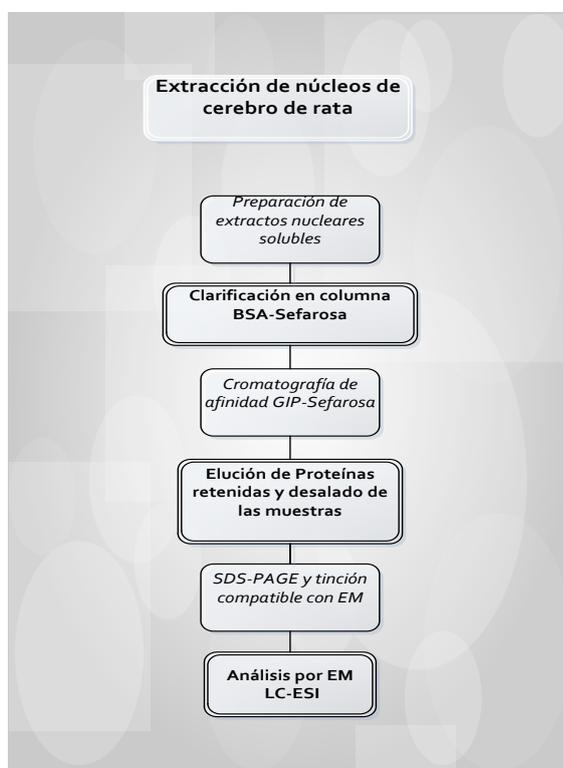
En la Figura 34 se recogen los ensayos inmunohistoquímicos en cortes coronales de cerebro de rata adulta. Se distinguió un fuerte marcaje perivascular muy heterogéneo en lo que parecen ser núcleos de células próximas al vaso (Fig. 34 I). Se pueden apreciar estructuras celulares perivascuales (Fig. 34 G) así como parches inmunopositivos en la periferia del vaso (Fig. 34 H y K).



**Figura (34). Inmunorreactividad perivascular para GIP en cerebro de rata.** La reactividad positiva fue clara en todas las áreas del cerebro analizadas: corteza, hipocampo, cerebelo y estriado. Se puede observar una intensa inmunotinción a nivel de la periferia del vaso que podría pertenecer a células de origen astrocitario (**G, H y L**) y de otros tipos celulares. También, se puede observar una tinción densa (**K**), así como núcleos inmunopositivos próximos al vaso (**J-I**). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

#### 4.8 Aislamiento y caracterización de proteínas nucleares que interactúan con GIP

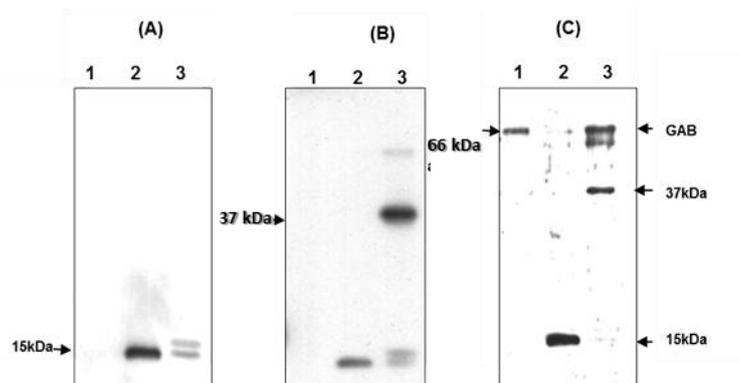
La amplia distribución celular y subcelular de GIP (características propias de proteínas multifuncionales PDZ), la postulan como un elemento importante en una gran variedad de procesos que podrían condicionar la funcionalidad de GAB (proteína que interacciona con GIP) y de otras proteínas en procesos relevantes; quizás, el mecanismo de importe nuclear de isoformas GIs2 sea una consecuencia de la interacción física ya demostrada (Olalla *et al.*, 2008). Una vez comprobada la existencia de la proteína en el núcleo celular de cerebro de rata tras la puesta a punto de métodos de inmunodetección, procedimos al aislamiento de proteínas nucleares de cerebro de rata que interactúan con GIP mediante una metodología proteómica que implica la cromatografía de afinidad y la espectrometría de masas (MS). La metodología utilizada para el desarrollo de este objetivo, se resume a continuación:



**Esquema resumen de la metodología proteómica implementada para este objetivo experimental**

#### 4.8.1 Aislamiento de proteínas nucleares que interaccionan con GIP mediante cromatografía de afinidad

Una vez obtenida la fracción nuclear y para asegurarnos que los núcleos purificados estaban libres de contaminación mitocondrial, realizamos un análisis mediante inmunotransferencia *Western* de las proteínas de la fracción nuclear, utilizando anticuerpos específicos para proteínas mitocondriales, en concreto, dirigidos frente a la subunidad IV de la citocromo-c oxidasa (COX IV). Como se observa en el panel A de la Figura 35, el anticuerpo reconoció una banda de 15 kDa en un extracto mitocondrial de cerebro de rata (calle 2) utilizado como control de contaminación.

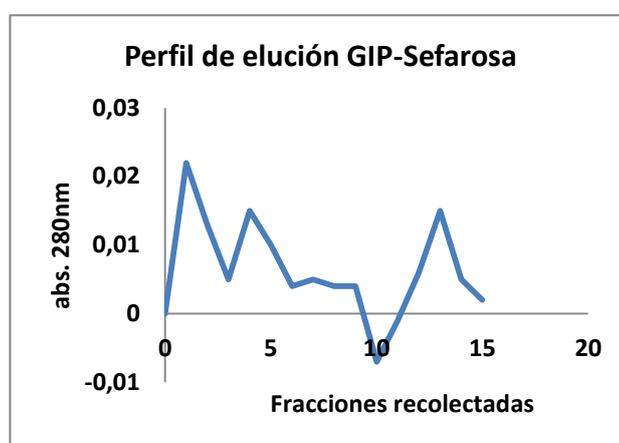


**Figura (35). Inmunotransferencia Western del extracto nuclear aislado de cerebro de rata.** Las proteínas fueron detectadas con tres tipos de anticuerpos primarios diferentes: Panel A, anticuerpo anti-COX IV (marcador mitocondrial); panel B, anticuerpo anti-TBP (marcador nuclear) y; panel C, anticuerpo anti-GAB (específico de GAB). La misma membrana se fue incubando secuencialmente con los tres anticuerpos primarios diferentes. Calle 1, proteína humana GAB recombinante pura; calle 2, extracto mitocondrial de cerebro de rata y; calle 3, extracto nuclear de cerebro de rata. La carga proteica total osciló entre 16 y 20  $\mu$ g y la membrana se reveló por quimioluminiscencia, como se describe en metodología experimental. Las flechas en los márgenes indican la masa molecular esperada para las proteínas GAB, proteína control de carga para núcleos y el control de carga mitocondrial empleadas.

Pese a las precauciones tomadas en el procesamiento de las muestras para evitar contaminación por orgánulos celulares diferentes a núcleos, una débil señal, que apareció como un doblete, se detectó en nuestra muestra de núcleos (panel A, calle 3), lo que supone una leve contaminación por mitocondrias, que en nuestro caso podría ser irrelevante comparado con la cantidad de proteínas nucleares presentes en la muestra. En el panel B, se muestra el revelado de la misma membrana con un anticuerpo control específico para núcleos (TBP). En la fracción nuclear se aprecia una banda de 37 kDa correspondiente a la proteína

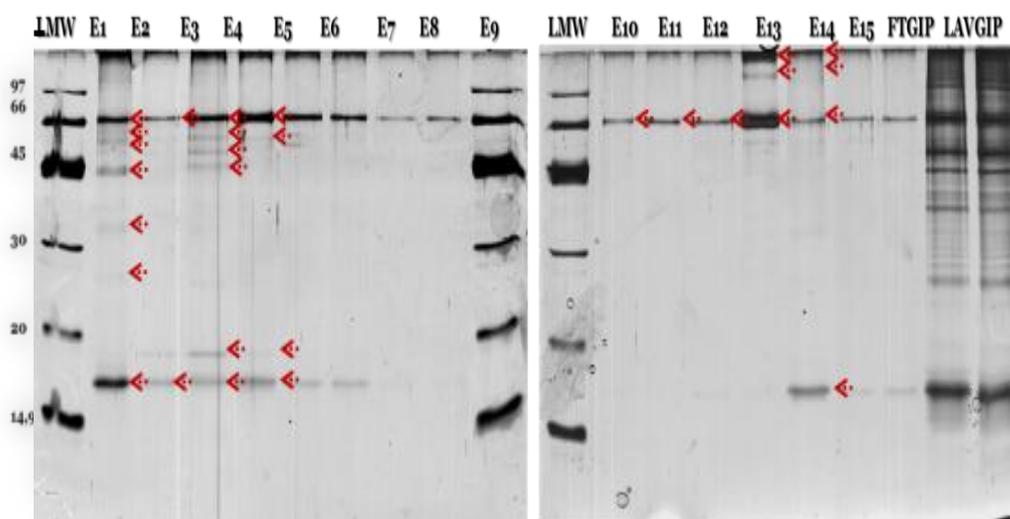
marcadora TBP (calle 3), que no aparece en la fracción mitocondrial (calle 2). Por último, el panel C demostró la presencia de GAB en la fracción nuclear (calle 3) y, con menos intensidad, en la fracción mitocondrial (calle 2), como se demuestra al compararlas con la banda de 66 kDa de proteína GAB pura (calle 1).

La columna GIP-Sefarosa fue lavada con una fuerza iónica alta (NaCl 0,35 M) propiciando la separación de proteínas que pudieran estar retenidas de forma inespecífica. Las proteínas asociadas con GIP se eluyeron en fracciones de 1 ml con NaCl 1 M. La Figura 36 muestra el perfil de elución de estas proteínas, resaltando los picos más relevantes cuando se midió su absorbancia a 280 nm.



**Figura (36). Elución de proteínas que interaccionan con GIP en la cromatografía de afinidad.** La representación gráfica del perfil de elución con cloruro sódico 1 M permite destacar 3 incrementos o picos de los valores de absorbancia a 280 nm. En el eje de ordenadas se muestran los valores de  $A_{280}$  de las fracciones individuales.

Las fracciones eluidas de la columna GIP-Sefarosa con cloruro sódico 1 M fueron desaladas y concentradas por separado (hasta un volumen final de 20  $\mu$ l) para ser analizadas por electroforesis SDS-PAGE, seguido de la detección de proteínas con tinción de plata compatible con EM. Las bandas de las proteínas detectadas (Fig. 37), fueron recortadas y analizadas por nHPLC y espectrometría de masas, empleando una trampa de iones con ionización por *electrospray* (ESI).



**Figura (37).** Análisis por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE y tinción de plata de las fracciones colectadas en la cromatografía de afinidad GIP-Sefarosa. LMW, marcador de masa molecular; FTGIP, eluato de la columna GIP-sefarosa (fracción no retenida) y LAVGIP, lavados (0.35 M de NaCl). Las flechas indican las bandas recortadas y analizadas por ESI-EM.

Después de la detección de las proteínas con nitrato de plata, las bandas que se vieron claramente en las diferentes fracciones se recortaron y se enviaron al servicio de Proteómica de la Universidad de Málaga para el estudio por espectrometría de masas, lo que nos permitió identificar los diferentes péptidos que han interactuado con alta afinidad con nuestra proteína. De las calles E 1-3, se recortaron las bandas de mayor intensidad con una masa aproximada de 66, 50, 35, 30, 18 kDa. La intensidad de las bandas se asocia directamente con la cantidad de proteína, lo que nos indica que estas fracciones están bastante enriquecidas. Estas bandas se han analizado por separado. También recortamos de estas mismas calles las bandas con una masa molecular aproximada de 60 kDa. En las calles E4-9 se cortaron las bandas a una masa aproximada de 66,60 y 18 kDa. En las calles E 10-11, se recortaron las bandas de 66 kDa y en las calles 12 y 13, se recortaron las bandas de una masa aproximada a 100, 120, 66, 50,35, 30, 18 kDa. Estas bandas recortadas se analizaron por separado.

#### 4.8.2 Identificación de proteínas que interactúan con GIP mediante espectrometría de masas

La Tabla I recoge todas las proteínas putativas que interactúan con GIP, analizadas e identificadas mediante un equipo de nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones ESI. Las diferentes proteínas se indican por su número de acceso en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), su nombre (usaremos generalmente el inglés para evitar confusiones e identificar sin ambigüedad la proteína), la puntuación obtenida en la búsqueda realizada en la base de datos Mascot, el número de bandas proteicas diferentes del gel SDS-PAGE donde ha sido identificada y algunas propiedades estructurales como la masa molecular y el punto isoeléctrico.

Recalcar que todas las proteínas aquí incluidas, fueron detectadas en al menos dos de los tres análisis independientes efectuados, descartándose aquellas proteínas que sólo aparecieron en un análisis.

**Tabla I: Análisis e identificación de proteínas frente a la base de datos MASCOT**

(ID: código de identificación de la proteína; MM: masa molecular; pI: punto isoeléctrico; F: frecuencia).

<i>ID</i>	<i>Nombre</i>	<i>MM</i>	<i>pI</i>	<i>MASCOT SPROT</i>	<i>F</i>	<i>Nº bandas</i>
<i>MBP_RAT</i>	<i>Myelin basic protein S</i>	21,4	11,2	228	9	3
<i>ROA2_RAT</i>	<i>A2/B1</i>	37,5	8,9	108	5	1
<i>AAF07822</i>	<i>Protein piccolo</i>	531	6,32	88	20	18
<i>S13520</i>	<i>Coat protein beta chain B-COP</i>	108,1	5,78	85	14	1
<i>APC_RAT</i>	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>	312,6	7	84	12	3
<i>AAC36493</i>	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog</i>	203	5,56	79	8	4
<i>PLCB4</i>	<i>1-phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4</i>	134,49	5,91	77	10	1

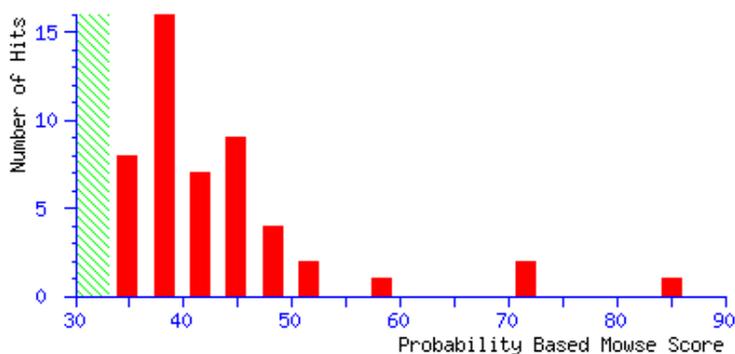
<b>H2B1_RAT</b>	<i>Histone H2B type 1</i>	13,9	10,3	77	4	1
<b>A43359</b>	<i>microtubule-associated protein MAP1A</i>	308	14	76	14	2
<b>AX951860</b>	<i>CAF05437</i>	296,4	1	69	11	2
<b>O70511_RAT</b>	<i>270 kDa ankyrin G isoform</i>	285,7	7,9	68	9	2
<b>AAC36493</b>	<i>BRC A1_RAT</i>	203	5,6	68	15	6
<b>AAA91895</b>	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	50	5,5	67	5	1
<b>VINC_RAT</b>	<i>Vinculin</i>	117	5,8	66	9	1
<b>BAA32459</b>	<i>Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3</i>	364	5,5	66	7	1
<b>DYHC2_RAT</b>	<i>Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1</i>	435	6	65	13	1
<b>Q5XI63</b>	<i>Kinesin-like protein KIFC1</i>	76,732	9,3	64	23	2
<b>Q6IG00_RAT</b>	<i>Type II keratin Kb4</i>	57,6	7,5	64	5	3
<b>Q7TN00</b>	<i>Tin N2B.A isoform</i>	375,7	5,64	63	11	4
<b>AAA74950</b>	<i>Myosin-9</i>	227,5	5,6	63	11	1
<b>Q9WU10_RAT</b>	<i>Protocadherin.</i>	505	4,9	62	10	2
<b>DYH7</b>	<i>Dynein heavy chain 7</i>	467,9	6,7	62	20	2
<b>UBR4_RAT</b>	<i>UBR4</i>	580,6	5,7	61	14	3
<b>JC5837</b>	<i>364K Golgi complex-associated protein</i>	364	4,5	60	12	1
<b>Q8CJ14_RAT</b>	<i>NESTIN</i>	209,5	4,3	59	20	1
<b>BAB61904</b>	<i>Cadherin-23</i>	365,8	5,5	59	7	6
<b>CO5A1_RAT</b>	<i>Collagen alpha-1(V) CHAIN</i>	184,5	4,8	59	7	1
<b>S46217</b>	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>	184	14	59	7	1
<b>AAR16316</b>	<i>Cortactin binding protein 2</i>	181	5	58	8	2
<b>LIPA3_RAT</b>	<i>Liprin-alpha 3</i>	133,9	5,8	58	9	1
<b>Bsn</b>	<i>Protein bassoon</i>	420,18	5,5	57	12	5
<b>Q63123</b>	<i>Collagen alpha 1</i>	135	6,4	57	9	1
<b>UBP54</b>	<i>Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54</i>	178,7	1,78	56	7	1
<b>HNRPM_RAT</b>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (Hnrp m)</i>	74	8,9	56	20	3
<b>Q80ZF0_RAT</b>	<i>Collagen type XXVII proalpha 1 chain</i>	188,6		56	9	4
<b>SCNBA_RAT</b>	<i>Sodium channel protein type 11 subunit alpha</i>	204	8,5	56	5	1
<b>PDZD2</b>	<i>PDZ domain-containing protein 2</i>	250	14	55	10	3
<b>MYO9A</b>	<i>Myosin-IXa</i>	303,4	5	55	10	2

<b>APOB</b>	<i>Apolipoprotein B-100</i>	537,7	5,5	55	21	2
<b>Q71LX6_RAT</b>	<i>L-NAME induced actin cytoskeletal protein</i>	375,8	5,7	55	13	1
<b>Q6S395</b>	<i>Plectin 11</i>	519	5,6	55	12	1
<b>PLEC1_RAT</b>	<i>Plectin 1</i>	535,18	5,7	54	22	2
<b>Q7TPK2_RAT</b>	<i>Ac2-120</i>	238	5,41	53	8	1
<b>CORA1_RAT</b>	<i>Collagen alpha-1(XXVII)</i>	188,6		53	7	4
<b>DYH1_RAT</b>	<i>Dynein heavy chain 1, axonemal</i>	519,1	5,6	53	16	1
<b>CAA37637, Tgoln2</b>	<i>Trans-Golgi network integral membrane protein</i>	382,82	8,25	53	18	1
<b>AAD09246</b>	<i>Vigilin</i>	120	9	53	9	2
<b>S28259</b>	<i>androgen-regulated epididymal protein precursor</i>	91,8	14	53	12	1
<b>Q6TXE7</b>	<i>GRTP1</i>	278,2	8,2	52	9	2
<b>CO1A1_RAT</b>	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	138,9		52	9	1
<b>Q6WRH9_RAT</b>	<i>Immunoglobulin superfamily member 10</i>	286		52	9	2
<b>Q6S3A0</b>	<i>Plectin 6</i>	535,4	7,7	52	15	1
<b>DYH12</b>	<i>Dnah12</i>	359,9	5	51	16	1
<b>GON4L_RAT</b>	<i>GON-4-like protein</i>	249,9	4,82	51	8	1
<b>BAT2_RAT</b>	<i>Large proline-rich protein BAT2</i>	229,4	9,4	51	5	2
<b>S06006</b>	<i>myosin beta heavy chain,</i>	223,7	14	51	7	1
<b>Q6MG48_RAT</b>	<i>HLA-B associated transcript 2, BAT 2</i>	229	9,47	50	11	1
<b>Q63269</b>	<i>IIPR3</i>	307	6	50	13	1
<b>Q6S3A5</b>	<i>Plectin 1</i>	520	5,6	50	9	1
<b>Q66HB5_RAT</b>	<i>Radial spoke head 10 homolog B</i>	102,2	6,58	50	7	1
<b>IRS1_RAT</b>	<i>Insulin receptor substrate 1</i>	132,3	9	50	6	1
<b>S06005</b>	<i>myosin alpha heavy chain</i>	224,1	3,4	50	8	
<b>PKHA4_RAT</b>	<i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 4</i>	86	10,2	50	10	2
<b>SPKAP_RAT</b>	<i>A-kinase anchor protein SPHKAP</i>	184,45	4,9	49	24	1
<b>CO2A1_RAT</b>	<i>COA2A1</i>	135	6,1	48	8	3
<b>Q6XD99</b>	<i>Non-erythroid spectrin beta</i>	246,4	5,5	48	6	1
<b>Q66H34_RAT</b>	<i>UPF0501 protein KLA1430 homolog</i>	61	14	48	4	1
<b>P02466 (CO1A2_RAT)</b>	<i>Collagen alpha-2(I) chain</i>	91,7	10,02	47	8	
<b>ECH1_RAT</b>	<i>Delta (3,5)-Delta (2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i>	36,4	6,2	47	7	1

<i>TR150_RAT</i>	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>	108	10,16	46	11	2	
<i>MYH9_RAT</i>	<i>MYOSIN 9</i>	227,5	5,9	46	12	1	
<i>CCD93_RAT</i>	<i>Coiled-coil domain-containing protein 9</i>	72,8	7,26	46	5	1	
<i>Q9JKU3</i>	<i>Selective LIM binding factor</i>	199,2	6	46	8	1	
<i>Histone H1.2</i>		21,8	11,8	5,98	45	4	2
<i>Q8VHZ8_RAT</i>	<i>Down syndrome cell adhesion molecule DSCAM</i>	222	7,9	45	7	1	
<i>THOC5</i>	<i>THO complex subunit 5 homolog</i>	79,3	6	44	15	1	
<i>NEB1_RAT</i>	<i>Neurabin-1</i>	122,9	5,8	44	6	1	
<i>DYHC1</i>	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	534,7	6,7	44	22	1	
<i>H1T</i>	<i>Histone H1t</i>	21,7	5,98	44	7	1	
<i>FAT3_RAT</i>	<i>FAT3</i>	505,1	4,7	43	11	1	
<i>E4IL5_RAT</i>	<i>Band 4.1-like protein</i>	82	6,2	43	3	1	
<i>T31671</i>	<i>Madd</i>	177.39	119,1	42	6	1	
<i>Q9QX70</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	138,2	6.6	41	7	1	
<i>T41751</i>	<i>I-afadin</i>	208,47	14	40	7	1	
<i>PERT</i>	<i>Thyroid peroxidase</i>	103,2	4	36	7	1	

La puntuación total asignada por el programa Mascot a cada proteína se obtiene como suma de las puntuaciones asignadas a los iones identificados como pertenecientes a esa proteína en concreto. Las puntuaciones de los iones se calculan como: **Puntuación** =  $-10 \times \log P$ , donde **P** es la probabilidad de que la asignación haya ocurrido al azar. Si la puntuación es una probabilidad real, entonces asignar un umbral de significatividad es simple: se trata de definirla como una función del número de comparaciones, esto es, el número de veces que comprobamos si existe similitud entre un péptido dado y la base de datos. Supongamos que nos resulta satisfactoria una probabilidad de 1 entre 20 (1/20) de obtener un falso positivo, y que estamos haciendo una búsqueda en una base de datos de espectros de masa que contiene 5000 péptidos que pueden compararse con nuestro péptido en cuestión. Entonces, la probabilidad de obtener ese falso positivo sería menor de  $1 / (20 \times 5000)$ , o sea de  $1 \times 10^{-5}$ , lo que origina una puntuación en Mascot de 50 que representa el umbral de incertidumbre o nivel mínimo de significatividad.

Para los resultados presentados en esta memoria, donde hemos utilizado la base de datos de espectros de masa MS/MS de rata, la puntuación del nivel mínimo de significatividad es 33 y aparece señalada en verde en la gráfica de la Figura 38. De esta forma, sólo aquellas asignaciones de proteínas con puntuaciones mayores a 33 indican una identidad o extensiva homología ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en la práctica se ha demostrado que este umbral de identidad es generalmente muy conservador, tras analizar la tasa de falsos positivos obtenida en búsquedas con bases de datos grandes. Por ello, también se consiguen positivos válidos con puntuaciones inferiores a este umbral de incertidumbre; en consecuencia, también se muestran algunos de estos potenciales positivos que interactúan con GIP con menor puntuación en la Tabla I, si bien la mayoría poseen puntuaciones iguales o superiores a 33.



**Figura (38).** Ejemplo de informe suministrado por el motor de búsqueda Mascot tras comparar las razones  $m/z$  de los péptidos trípticos analizados con los patrones de péptidos trípticos de la base de datos. En ordenadas se representa el número de hits o número de péptidos apareados para una proteína dada y en abscisas la puntuación probabilística total (score) de cada proteína como suma de los puntuaciones individuales de los péptidos identificados.

Para conseguir una presentación y discusión de los resultados más clara, hemos agrupado los positivos detectados que interaccionan con GIP en 4 grandes grupos, de acuerdo con sus funciones conocidas (Tabla II). Cuando una proteína tiene dos o más funciones bien caracterizadas, se ha tenido en cuenta en la Tabla II y por ello aparece en más de un grupo.

**TABLA II. Resumen de potenciales proteínas nucleares de cerebro de rata que interactúan con GIP, clasificadas de acuerdo con sus funciones conocidas.**

<b>GRUPO I</b>	<b>NEUROFILAMENTOS, MEMBRANA/ENVOLTURA NUCLEAR</b>	keratin CK-1, Keratina CK-5, Keratina CK-14, $\beta$ -Spectrin, Plectin 11, Nestin, <b>APC</b> , <b><math>\beta</math>-COP</b> .
<b>GRUPO II</b>	<b>REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL:</b>	<b>Histone H1.2</b> , Nucleolin, CASK, <b>BAT-2</b> , Zinc finger protein 219, hexokinasa 2, MAGED2, ELP1, NAC-1, Hnrnpa2b, <b>BRCA-1</b> , <b>Histone A2/B</b> , Selective LIM binding factor, <b>APC</b> , THO complex subunit 5 Homolog y MADD
<b>GRUPO III</b>	<b>CASCADAS/RUTAS DE SEÑALIZACIÓN:</b>	Cadherin-2, <b>APC</b> , <b>PLCB4</b> , <b>BAT2</b> y ITPR3
<b>GRUPO IV</b>	<b>FORMACIÓN Y TRÁFICO DE VESÍCULAS DE TRANSPORTE:</b>	<b>PICCOLO</b> , RABPHILIN-11, Synaptotagmin-17, <b><math>\beta</math>-COP</b> , KIFC1 y <b>BASSOON</b>

#### 4.8.3 String 9.0: búsqueda de interacciones proteína- proteína

El uso de servidores que permiten filtrar información útil, fiable y detallada de redes de asociación proteína-proteína se ha puesto en práctica en la actualidad. El servidor de *String 9.0* “*Functional protein association networks*”, predice una interacción funcional entre las proteínas Tax 1BP3, también conocida como GIP, con proteínas RTKN, GLS2, RHOA4, P2RX5 y Cuta, confirmadas recientemente. Con el fin de reforzar la criba realizada en función de la información suministrada por el motor de búsqueda MASCOT referente a posibles proteínas interactoras de GIP, realizamos análisis independientes para cada una de las proteínas que, en función de su puntuación y cobertura de secuencia, se seleccionaron para realizar las posteriores validaciones. Las gráficas de nodos exhiben conexiones con proteínas que se han recogido en la Tabla I y



#### **4.9 Validación de proteínas que interaccionan con GIP por SELDI-TOF-MS**

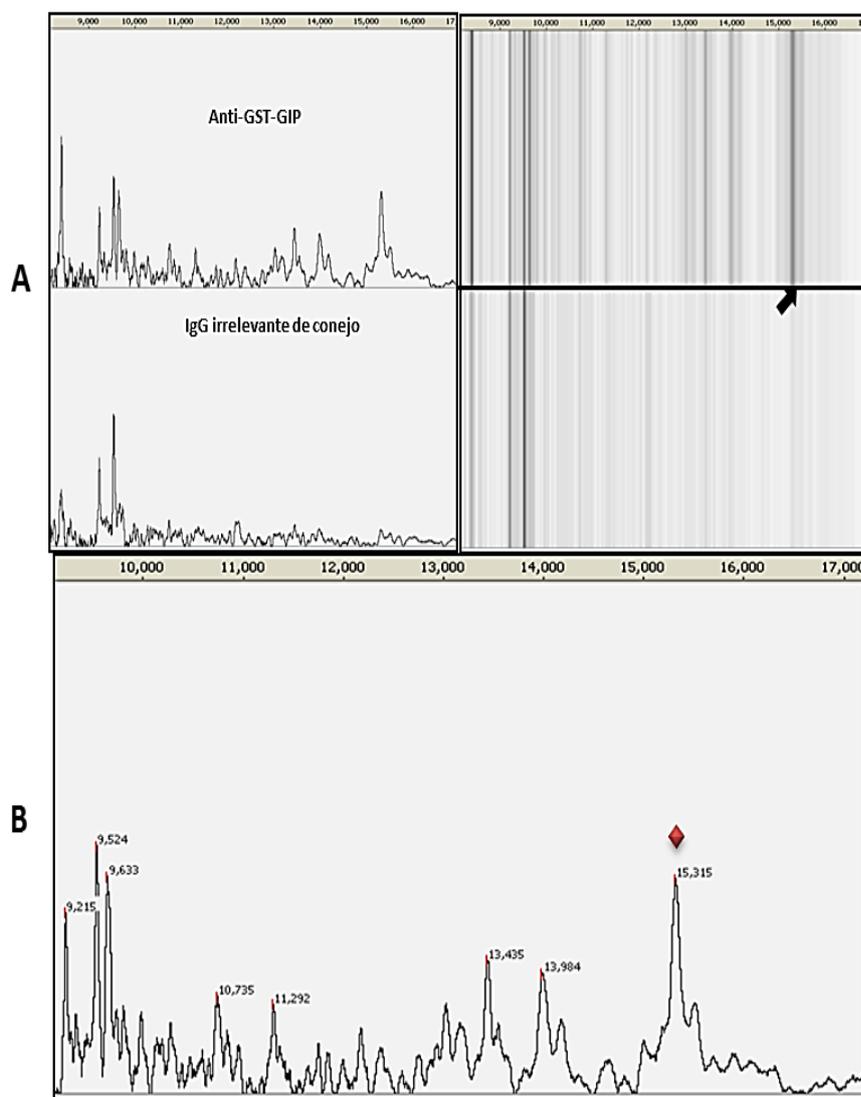
Los anticuerpos purificados frente a la proteína GIP humana se acoplaron a proteína G unida covalentemente a la superficie de un microchip de proteína (Bio-Rad) y se incubaron con 3 µg de extracto nuclear proteico de cerebro de rata por microgramo de anticuerpo. En los análisis SELDI se detectaron picos con una masa molecular aproximada a la proteína GIP nativa de rata sólo en ensayos con algunos anticuerpos frente a proteínas interactoras concretas. Realizamos una modificación en el protocolo empleado para las inmunocapturas que consistió en la adición de 500 femtomoles de la proteína GIP recombinante humana, empleado así como un estándar interno.

Como control negativo, incluimos IgGs irrelevantes de ratón y conejo, animales en los que se desarrollaron los anticuerpos que utilizamos en este procedimiento.

Las muestras de proteínas se cubren con una matriz que co-cristaliza con la muestra en la superficie del *array* y absorbe la mayor parte de la energía, las proteínas/péptidos se ionizan y aceleran hacia el detector a través de un tubo de vuelo (TOF, *time of flight*, por sus siglas en inglés). Las proteínas se separan según las diferencias en su relación masa/carga y se genera el perfil proteómico de picos. En comparación con los demás métodos existentes, SELDI es rápido, reproducible y posee una alta sensibilidad (límite de detección en el intervalo de femtomolar).

A continuación, se observan los espectros de masas obtenidos mediante SELDI-TOF, como resultado de la representación de la intensidad frente a la relación masa/carga ( $m/z$ ).

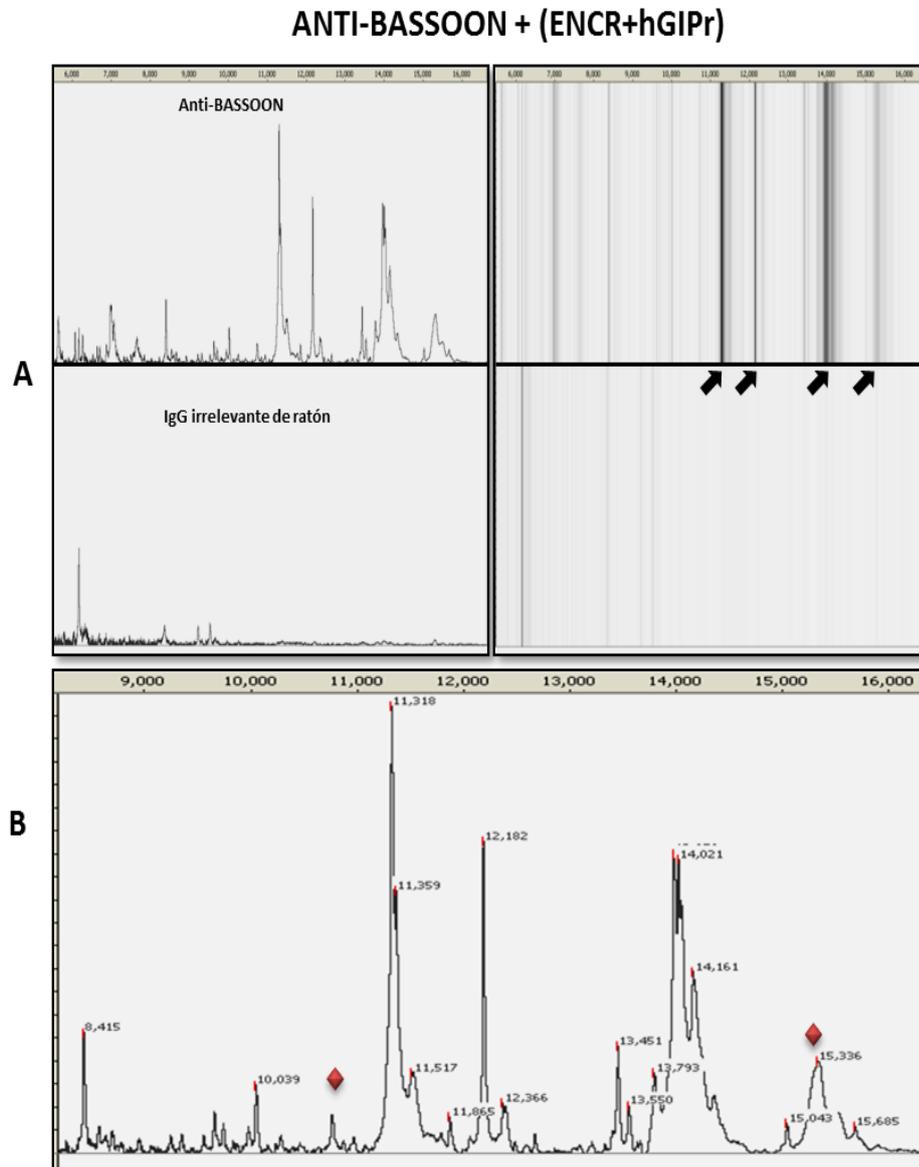
## ANTI-GST-GIP + (ENCR +hGIPr)



**Figura (40).** Espectros ( $m/z$ ) generados para el control positivo generado mediante el acoplamiento de anticuerpos anti-GST-GIP a los chips de proteínas funcionalizados con proteína G. Los chips fueron entonces incubados con una pequeña cantidad de extracto nuclear de cerebro de rata (ENCR) y con 500 femtomoles de proteína GIP humana recombinante (hGIPr). A) Visión espectral  $m/z$  generada para anticuerpo anti-GIP (imagen superior) y su respectivo control negativo (imagen inferior). En la parte derecha se muestra una visión en gel de la normalización de los datos espectrales frente al respectivo control negativo. B) Ampliación del espectro anti-GST-GIP. El pico de la proteína humana recombinante GIP fue detectado a un rango aproximado de 15300 Da (rombo rojo). También se observan perfiles de otras proteínas de bajo peso molecular.

Los picos de proteínas de alta y baja masa molecular se alinearon frente a su control negativo para descartar el ruido de fondo de cada uno de los anticuerpos utilizados en este experimento. Los picos que se corresponden con el rango de las masas moleculares de la proteína nativa y humana recombinante se marcan con rombos rojos.

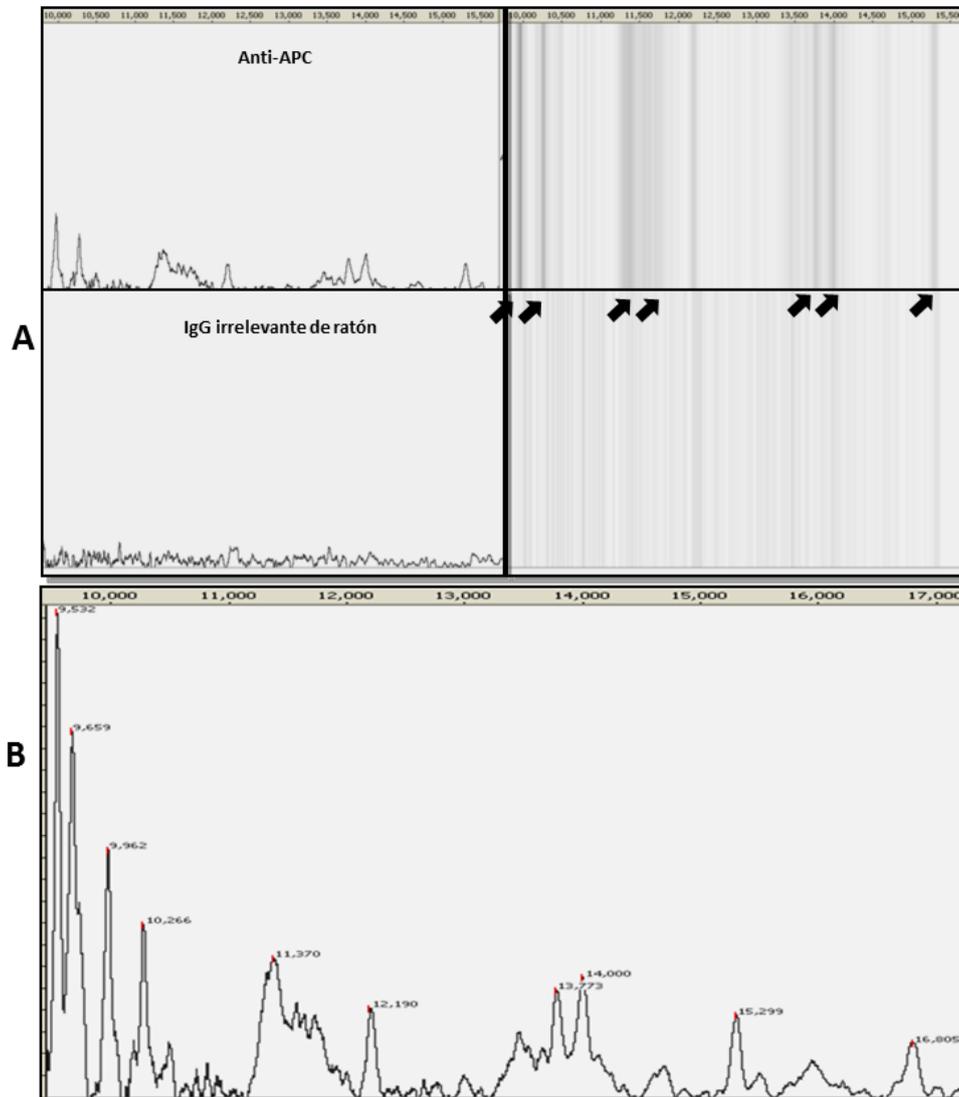
En todos los casos, el panel (A) representa la visualización en formato de gel (derecha) y espectral (Izquierda) de las proteínas detectadas y sus respectivos controles con IgG no relevante (imagen inferior). El Panel (B) representa los picos representativos detectados en el análisis y sus respectivas masas relativas.



**Figura (41). Análisis por espectrometría de masas del complejo de proteínas formado por bassoon.** Se detectaron varios picos de proteínas entre 9000 y 16000 Da. ENCR, extracto nuclear de cerebro de rata; hGIPr, proteína recombinante GIP humana. Los picos señalados coinciden con la masa molecular aproximada de la GIP nativa y la proteína recombinante humana (rombos rojo).

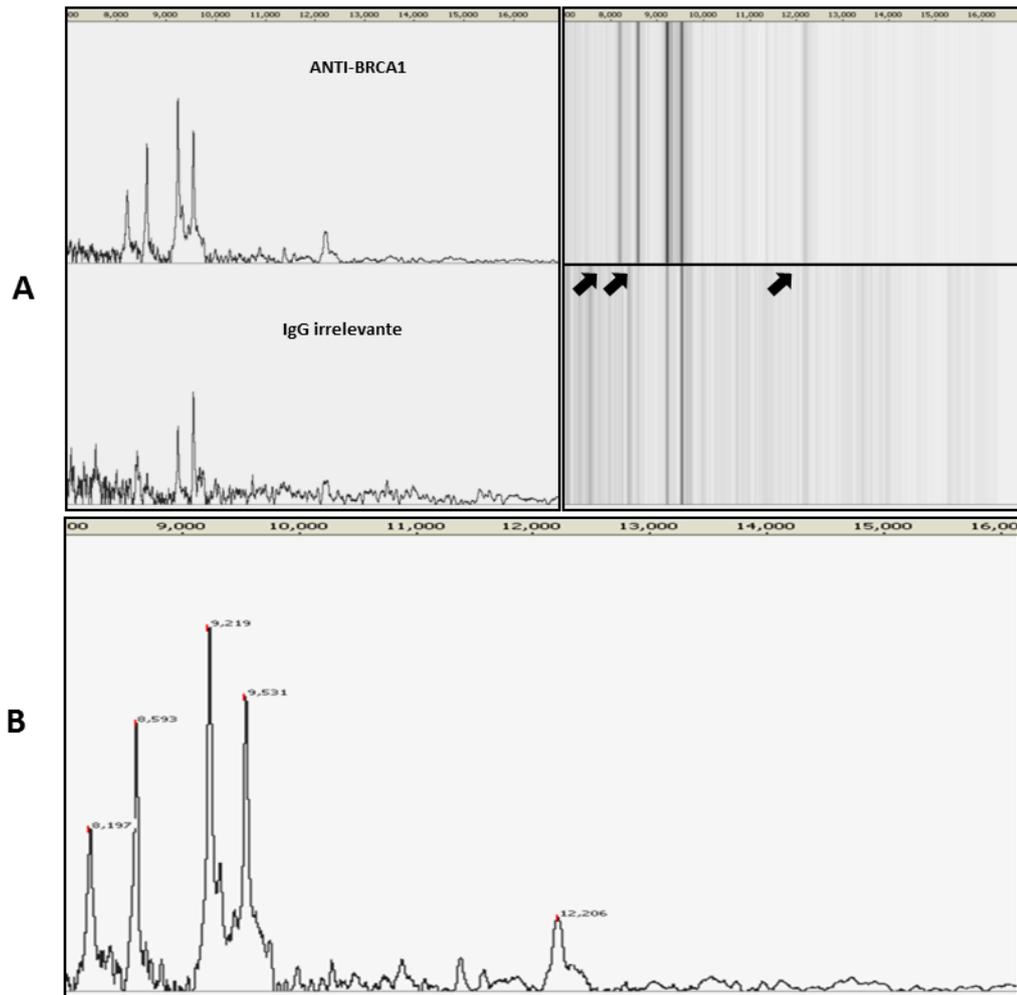
Estos picos son prominentes como en el caso del espectro generado por anti-GIP + (ENCR+GIP), en donde se observó un pico que coincide con la masa molecular teórica de la GIP recombinante humana. En todos los análisis se observaron perfiles correspondientes a proteínas de bajo peso molecular. En ningún caso, estos análisis permiten la identificación de las proteínas observadas en los espectros.

### ANTI-APC + ENCR



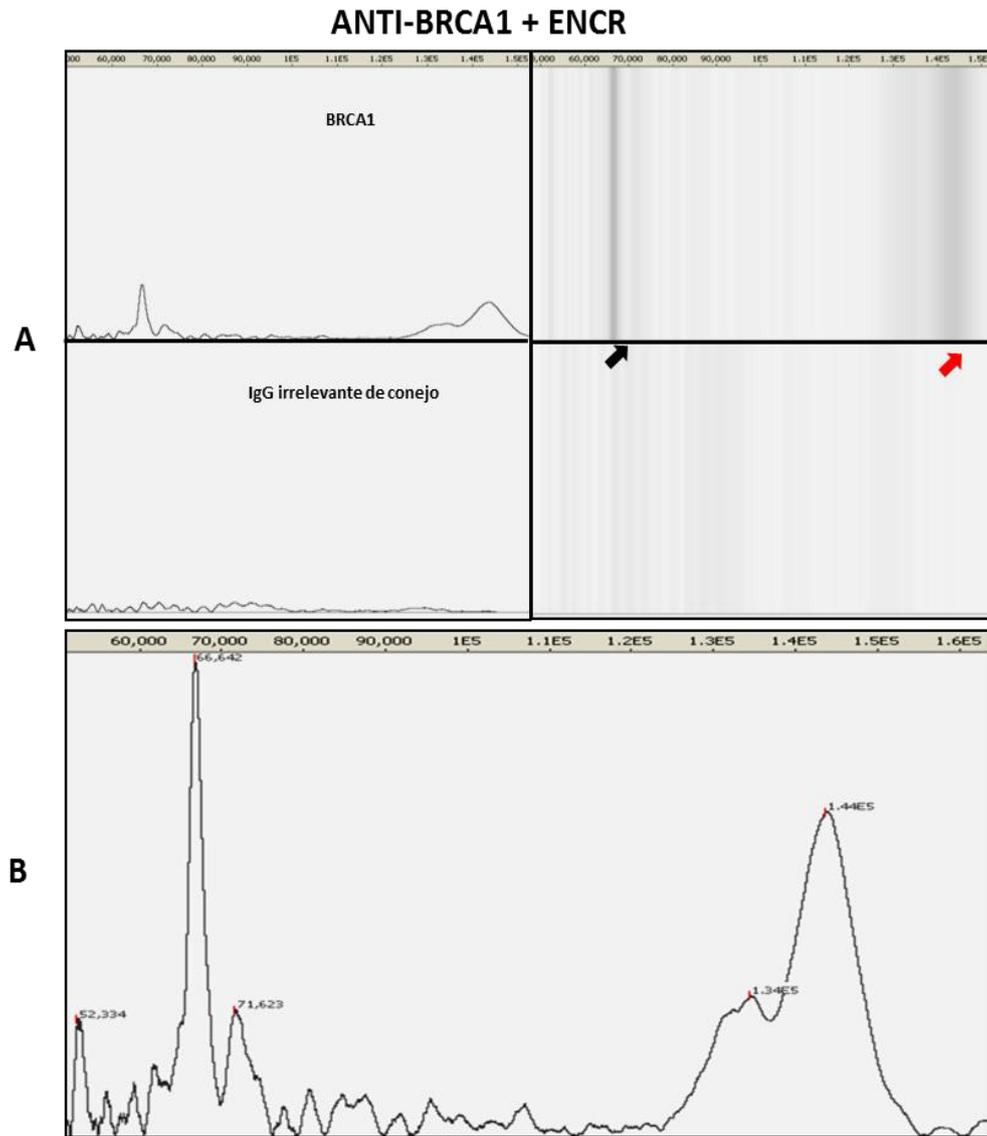
**Figura (42). Espectro m/z de proteínas que se asocian a APC. A)** Visualización en gel de las proteínas ionizadas con una relación m/z que oscila entre 13000 y 15000 Da. **B)** La muestra no contiene la proteína recombinante humana por lo que el pico correspondiente a 15300 Da no se marca. **B)** Ilustración espectral de proteínas de bajo peso molecular del complejo proteico formado por APC. Los datos obtenidos de este experimento, muestran abundantes proteínas entre 9000 y 1200 Da, siendo estos los picos más prominentes.

## ANTI-BRCA1 + ENCR



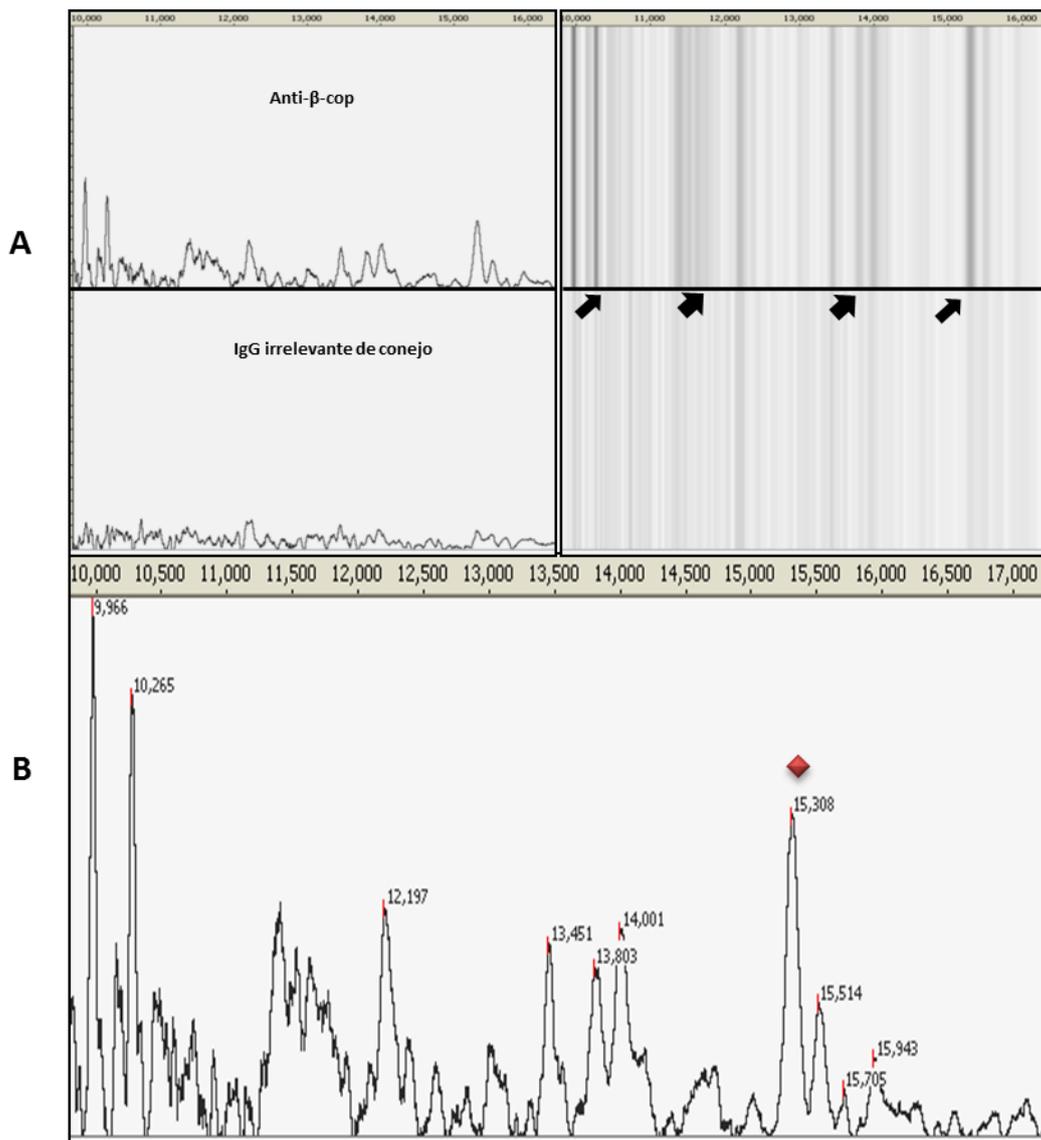
**Figura (43).** Ilustración espectral de proteínas de baja masa molecular del complejo proteico formado por *BRCA1*. La muestra omite la proteína hGIPr. Se observa un pico de menor intensidad cercano a 12000 Da y dos de mayor intensidad entre 8000 y 9000 Da.

Pese a que la mayoría de los anticuerpos reconocen proteínas de una masa superior a 200 kDa, el análisis SELDI-TOF se realizó con un protocolo enfocando a la detección de proteínas de bajo masa molecular.

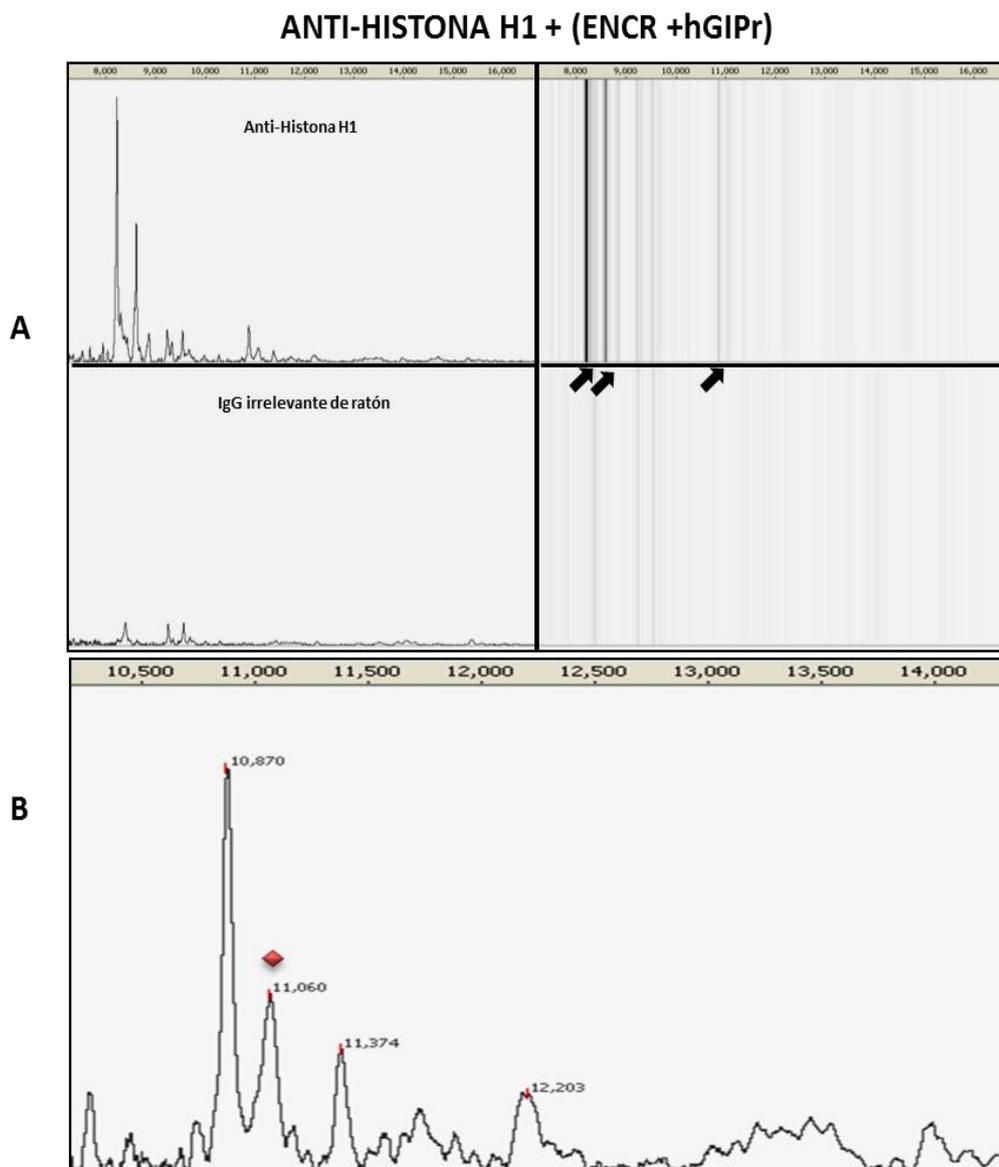


**Figura (44). Ilustración espectral de proteínas de alta masa molecular del complejo proteico formado por BRCA1. A)** Visión en gel: la muestra omite la proteína hGIPr. **B)** Se resaltan picos prominentes a una relación m/z de 66,642, 52,334 y 71,623, además se denota un pico que se corresponde con una de las bandas de contaminación por IgG a 145,000 Da

La unión de los anticuerpos a la proteína G no es covalente y es usual que después de ser analizados mediante tecnología SELDI-TOF, puedan aparecer picos en los espectros correspondientes a la IgG intacta (MH+ ~148 kD, M2H+ ~75 kD) o a sus fragmentos (~75 kD, ~48 kD, ~22 kD), especialmente cuando se usan altas energías de ionización. Estos picos pueden interferir con la detección o cuantificación de antígenos con una masa molecular similar.

ANTI- $\beta$ -COP + ENCR

**Figura (45).** Espectro de proteínas de baja masa molecular del complejo proteico formado por  $\beta$ -COP. **A)** visión en gel: se observan una diversidad de perfiles proteicos que oscilan entre 10000 y 16000 Da. **B)** Se señala con un rombo rojo el pico que se corresponde con la relación m/z de la proteína recombinante humana.

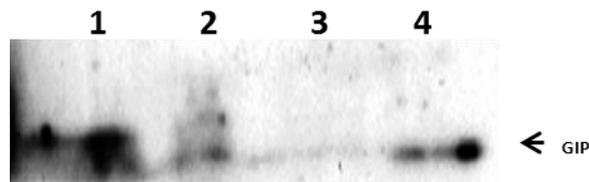


**Figura (46).** Espectro de proteínas de baja masa molecular del complejo proteico formado por Histona H1. **A) Visión en gel:** se observan una diversidad de perfiles proteicos que oscilan entre 10000 y 14000 Da. **B) Visión espectral:** el rombo rojo resalta el pico que se acerca a la masa molecular de la proteína nativa. En este experimento no se incluyó la proteína hGIPr.

Los experimentos presentados en este apartado se repitieron con un protocolo modificado para la digestión con tripsina de las proteínas capturadas sobre el depósito, con el fin de identificar las proteínas que hacen parte de los diferentes complejos mediante nano-HPLC-espectrómetro de masas de trampa de iones ESI.

#### 4.10 Validación del interacto Bassoon por inmunoprecipitación con anticuerpos e inmunotransferencia Western

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en SELDI TOF, decidimos reconfirmar estas interacciones con experimentos de co-inmunoprecipitación. Este ensayo es el más utilizado para confirmar y detectar interacciones proteína-proteína. La inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-Bassoon permitió precipitar su antígeno correspondiente a partir de una mezcla enriquecida con proteínas solubles de núcleos de cerebro de rata y además, como indicativo de una interacción física, la proteína GIP fue visualizada mediante WB de las fracciones eluidas, incubando los proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo anti-GIP específico.



**Figura (47).** SDS-PAGE e inmunotransferencia Western de las fracciones eluidas con policlonal de conejo anti-GIP. Calle 1, extracto nuclear; calle 2, flowthrough; calle 3, Co-IP con anticuerpo irrelevante; calle 4, Co-IP con anticuerpo anti-Bassoon.

## *Discusión*

## **5.1 Expresión de GA en cerebro de mamíferos.**

### **5.1.1 Expresión de GA en neuronas**

Como se ha expuesto a lo largo de esta memoria, la GA se considera la principal enzima de síntesis del neurotransmisor excitador Glu en el cerebro de mamíferos, dado que dicho transmisor es sintetizado principalmente a partir de Gln. Por este motivo, la enzima se ha empleado como un marcador de neuronas glutamatérgicas. El concepto generalizado tradicional que consideraba la existencia en cerebro de únicamente isoformas KGA, y no de isoenzimas Gls2 (Curthoys y Watford, 1995), se ha demostrado erróneo gracias a aportaciones recientes de nuestro grupo (Olalla, 2002; Olalla *et al.*, 2002). Sin embargo, el nuevo patrón de expresión de GA, a pesar de estar suficientemente demostrado, está tardando en ser asimilado por la comunidad científica involucrada en estudios de regulación de la neurotransmisión glutamatérgica. Esto ha hecho que, por ejemplo, estudios de distribución de GA en el SNC se hayan realizado exclusivamente con sondas específicas para la isoforma KGA, lo que puede dar lugar a resultados distorsionados al ignorar la expresión de las isoenzimas Gls2 (Masson *et al.*, 2006). La mayor parte de estos estudios de expresión de GA en cerebro de mamíferos, se han realizado en rata y existen muy pocos estudios sobre la expresión de GA en otras especies. Como ejemplo, existen algunos trabajos realizados en corteza cerebral humana y de mono (Akiyama *et al.*, 1990; Donoghue *et al.*, 1958) y otros estudios realizados en determinadas regiones cerebrales de cobaya (Altschuler *et al.*, 1984, 1985; Donoghue *et al.*, 1985; Turman y Chandler, 1994; Wenthold *et al.*, 1986), ratón (Blanco *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2013) y gato (Van der Gucht *et al.*, 2003; Fisher, 2007).

En el presente trabajo hemos estudiado la localización a nivel regional en cerebro de rata de las isoformas GA empleando técnicas inmunocitoquímicas y nuevos anticuerpos isoenzima específicos, como primer paso para dar cumplimiento a uno de los principales objetivos experimentales propuestos en esta memoria, la búsqueda de nuevas localizaciones celulares (astrocitos) y

subcelulares (núcleo) de GA en cerebro de mamíferos. Decidimos, en primer lugar, confirmar la reproducibilidad del patrón de expresión de isoenzimas GA, previamente descrito por nuestro grupo de investigación (Olalla , 2002; Olalla *et al.*, 2002). Para la realización de este estudio inmunocitoquímico se han utilizado anticuerpos policlonales isoforma-específicos anti-GAB y anti-KGA desarrollados tanto en rata como en conejo. La especificidad de las señales inmunoreactivas positiva para cada isoforma se comprobó preadsorbiendo los anticuerpos con los correspondientes antígenos purificados, y realizando después inmunotransferencias Western y ensayos inmunocitoquímicos. Donde se comprobó que de esta forma dichas señale desaparecen.

Hemos podido comprobar que ambas isoformas se expresan abundantemente en regiones cerebrales ricas en neuronas y/o sinapsis glutamatérgicas como corteza cerebral, hipocampo, estriado y cerebelo. En la corteza, la reactividad nuclear de GAB fue clara en todas sus áreas, mientras que la isoenzima KGA mostró un patrón de tinción citosólico, de aspecto granular (característico del marcaje mitocondrial) y de mayor intensidad en células piramidales. Además de ser el principal neurotransmisor excitador, el Glu es precursor metabólico de GABA, Asp y Gln, por lo que era de esperar una amplia distribución de este aminoácido y de sus enzimas de síntesis en las neuronas corticales piramidales (unidades excitatorias primarias de la corteza) y no piramidales.

La localización mitocondrial de KGA se ha demostrado ampliamente por estudios inmunocitoquímicos previos (ver Márquez *et al.*, 2010 para una revisión reciente). Esta localización resulta consistente con el papel de la isoenzima KGA en el metabolismo energético y nitrogenado de las neuronas, así como con su contribución, presumiblemente mayoritaria dado su nivel de expresión, en la generación del Glu neurotransmisor. Este hecho se ha comprobado en cultivos primarios de célula granulares cerebelosas de rata neo-natal, en donde se observó un aumento en la expresión de los niveles de mRNA y de proteína GA a medida que las células se diferenciaban entre días 3 y 8. Además, este aumento fue paralelo a un incremento en la liberación de Glu, formación de neuritas y de

vesículas sinápticas (Thomas *et al.*, 1989). La inducción de la GA en el desarrollo de células granulares es consistente con su papel como enzima de síntesis del neurotransmisor glutamato. En cambio, la proteína GAB (LGA) se ha encontrado mayoritariamente en el núcleo de las células neuronales, confirmando la localización previamente identificada por nuestro grupo (Olalla *et al.*, 2002). Esta localización extramitocondrial de GAB en cerebro podría suponer que la enzima desempeña funciones diferentes a las catalíticas. Entre las posibles funciones nucleares de las isoenzimas Gls2 (GAB/LGA) nuestro grupo ha sugerido su implicación en la diferenciación celular a partir del análisis de resultados en células tumorales tanto de hepatomas como leucemias (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). Estos resultados fueron confirmados posteriormente también en células de glioblastoma humano de la línea T98G (Szeliga *et al.*, 2009). Este hecho será discutido ampliamente en apartados posteriores.

Muy recientemente, Velletri *et al.* han publicado evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis, trabajando con cultivos *in vitro* de neuronas corticales embrionarias (E17.5) de ratón. La inhibición de la actividad GA, al eliminar la Gln del medio de cultivo, frenó la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales. Además, la expresión de Gls2 aumentó *in vivo* durante el desarrollo postnatal del cerebelo de ratón: la cantidad de mRNA Gls2 se incrementó entre 3 y 4 veces al primer día post-natal (P1) respecto al valor P0, y se mantuvo en esos niveles aumentados hasta P8, una etapa del desarrollo asociada con una masiva expansión de células progenitoras de células granulares (Velletri *et al.*, 2013).

Al igual que en la neo corteza, la base citoarquitectónica del hipocampo está constituida por las neuronas principales de naturaleza glutamatérgica. Estas células principales (neuronas piramidales del asta de Ammon y células granulares del giro dentado) representan el 90% de las neuronas hipocampales. El 10% restante de las células hipocampales está formado por interneuronas de naturaleza GABAérgica, que controlan y regulan la actividad de las células principales (Freund y Buzsáki, 1996). Hemos encontrado que las neuronas piramidales hipocampales expresan ambas isoformas de GA. Mientras que la expresión de GAB muestra una leve disminución en la intensidad del marcaje

nuclear en el subcampo CA3, la isoforma KGA se expresó con mayor intensidad en esta región del asta de Ammon. La isoforma KGA se expresa de forma diferencial en hipocampo, siendo el subcampo CA3 el de mayor intensidad. Esta expresión fue observada anteriormente con otros anticuerpos anti-KGA (Kaneko y Mizuno., 1988; Olalla *et al.*, 2002) y confirmada posteriormente en humanos, concretamente, en mitocondrias del soma neuronal, dendritas y terminales nerviosos de estas áreas (Eid *et al.*, 2006). En el caso del subcampo CA1 y de las células granulares del giro dentado, la inmunotinción de los somas fue débil, mientras que la marca nuclear de la isoforma GAB en giro dentado fue muy intensa. Sin embargo, las regiones de proyección de estas células, subículo/corteza entorrinal y región CA3, mostraron una intensa inmunotinción punteada en el neuropilo para KGA, que podría corresponderse con terminales nerviosos de estas aferencias. Como hemos mencionado en la introducción, la localización espacial de KGA puede verse influenciada por su asociación con otras proteínas. Así, la proteína KGA se asocia *in vivo* e *in vitro* con caitaxina en hipocampo y cerebelo, regulando su actividad y localización subcelular desde mitocondrias del cuerpo celular a neuritas terminales (Buschdorf *et al.*, 2006).

Otra de las regiones con fuerte inmunorreactividad Gls2 y KGA fue el cerebelo. Como se ha comentado con anterioridad, el Glu no actúa únicamente como neurotransmisor excitador sino que también es el precursor inmediato del neurotransmisor inhibitor GABA (Ottersen y Storm-Mathisen 1984; Roberts, 1981). Por lo tanto, la enzima GA podría estar presente también en neuronas inhibitoras GABAérgicas. En cerebelo se encontró una abundante inmunorreactividad para KGA en células de naturaleza inhibitora GABAérgica (células de Purkinje) y la capa granular de naturaleza glutamatérgica. La isoforma GAB se encontró en núcleos de neuronas GABAérgicas de la capa molecular (células estrelladas y en cesto), siendo la tinción mayoritaria en núcleos de la capa granular. De nuevo, la fuerte tinción nuclear de Gls2 en cerebro podría indicar que está implicada en otras funciones aparte de la catalítica. En estudios inmunocitoquímicos en cerebelo de rata, se demostró que KGA está presente en alta densidad únicamente en los terminales nerviosos de las fibras musgosas,

mientras que su presencia en los terminales nerviosos de las fibras paralelas fue escaso o indetectable y similar a la encontrada en neuronas no-glutamatérgicas (Laake *et al.*, 1999). Este resultado cuestionaba el papel de la GA en la síntesis del neurotransmisor Glu en las sinapsis de las células de Purkinje y de las fibras paralelas cerebelosas. Sin embargo, en un estudio más reciente utilizando anticuerpos frente a Glu, otros autores sí encontraron síntesis activa de Glu a partir de Gln en esas fibras, producción que fue completamente abolida por la presencia del efector 6-diazo-5-oxo-norleucina (DON), un conocido inhibidor de la GA (Holten y Gundersen, 2008). Estos autores plantean que el Glu generado por la GA serviría como sustrato para la síntesis para Asp y GABA, aminoácidos que también incrementaron sus niveles durante la despolarización siempre que se mantuvo Gln en el medio. Por último, dan una explicación a los resultados de Laake y colaboradores (a la ausencia de GA en las fibras paralelas descrita en su trabajo) basándose en que emplearon exclusivamente anticuerpos anti-KGA y, por consiguiente, no resultaría descabellado pensar que fueron capaces de detectar con ellos las isoformas Glu2 (Holten y Gundersen, 2008), que hemos visto que también se expresan en cerebelo.

La expresión de KGA en terminales nerviosos glutamatérgicos y GAB en estriado se ha confirmada en el presente este trabajo y en otros ya descritos con diferentes anticuerpos anti-GA (Kaneko y Mizuno, 1992; Olalla *et al.*, 2002). La presencia de KGA en interneuronas de gran tamaño, de naturaleza colinérgica, confirman los resultados descritos por otros autores (Senba *et al.*, 1991; Clements *et al.*, 1991; Kaneko *et al.*, 1989). La liberación de Glu por terminales colinérgicos ha sido determinada en sinaptosomas de corteza cerebral (Docherty *et al.*, 1987). Es posible que el Glu liberado por los terminales colinérgicos actúe sobre receptores de Glu presinápticos, cuya acción moduladora sobre la liberación de acetilcolina ha sido demostrada (Cartmell y Schoepp, 2000; Takumi *et al.*, 1999; Vizi y Kiss, 1998) al igual que su presencia en células dopaminérgicas, monoaminérgicas y serotoninérgicas (Kaneko *et al.*, 1990; Sulzer *et al.*, 1998; Rayport, 2001; Johnson, 1994). La presencia de transcrito y proteína KGA, así

como de actividad enzimática, en el estriado dorsal y la corteza prefrontal se ha confirmado posteriormente (Blanco *et al.*, 2012).

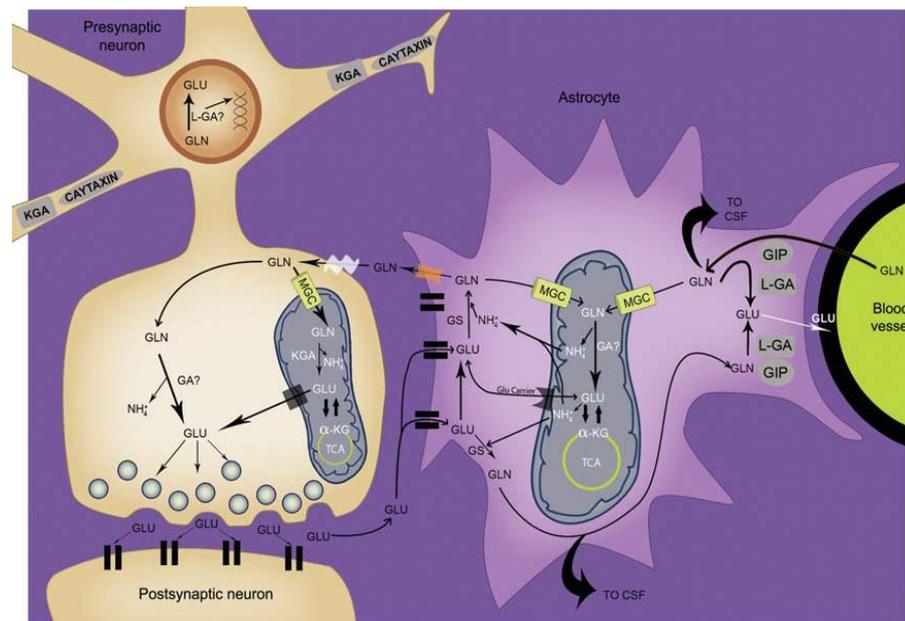
### 5.1.2 Expresión de GA en astrocitos

Los resultados descritos en esta memoria empleando la tinción específica de actividad GA en tejido cerebral, demuestran que la actividad enzimática coincide con el patrón de expresión a nivel de proteína y se localiza principalmente en todas las regiones involucradas en la neurotransmisión glutamatérgica. En cerebelo, la tinción mostró una actividad diferencial y específica de la capa granular compuesta principalmente de neuronas pequeñas de naturaleza glutamatérgica. Además, también observamos actividad enzimática en poblaciones celulares de naturaleza GABAérgica como células de Purkinje y la capa molecular (menos reactiva).

En hipocampo, la tinción de actividad fue más intensa en el giro dentado y la región CA3, lo que indicaría que la actividad enzimática procedería preferencialmente de las isoformas KGA y/o GAC. Esta afirmación se refuerza por el hecho de que no se observó una correlación entre la expresión de GAB y la actividad enzimática: no se observó actividad GA nuclear en ninguna de las regiones ni áreas analizadas, que podría deberse no a su ausencia sino a que la tinción basada en la enzima auxiliar GDH, no es lo suficientemente sensible para detectar la pequeña actividad GA nuclear. No obstante, hemos demostrado la existencia de GAB en el núcleo celular mediante inmunotransferencia Western y mediante técnicas inmunocitoquímicas. Posteriormente, se detectó la actividad enzimática GA en núcleos aislados de cerebro de rata libres de contaminación mitocondrial y, observamos que la actividad enzimática tenía características cinéticas y reguladoras mixtas entre las isoformas KGA y LGA (Olalla *et al.*, 2002). Estos resultados nos llevaron a sugerir la existencia de una nueva isoforma GA (Márquez *et al.*, 2009; de la Rosa *et al.*, 2009). Por otra parte, la abundancia de transcritos Glis en cerebro es muy superior a la de Glis2 (Blanco *et al.*, 2012; Martín-Rufián *et al.*, 2012), siendo las isoformas KGA/GAC más eficientes en la

hidrólisis de Gln que las Gls2 (Márquez *et al.*, 2010). Por todo lo expuesto, no podría excluirse actividad catalítica de Gls2 aún cuando esta no ha podido ser detectada *in situ*.

La actividad enzimática GA también fue identificada *in vivo* en poblaciones discretas de astrocitos, concretamente en corteza y cerebelo de rata. La marca de actividad en astrocitos fue considerablemente inferior a la obtenida en neuronas de esas dos regiones cerebrales. Este hecho es de especial relevancia, dadas las implicaciones fisiopatológicas que puede tener la generación de Glu y amonio a partir de Gln en células gliales. Un aspecto muy importante aún no resuelto, y relacionado con el ciclo Gln/Glu, es si existe síntesis de Glu a partir de Gln en los astrocitos; esto es, si los astrocitos poseen o no actividad GA. Una actividad GA en astrocitos (a falta de confirmar si es mitocondrial) encajaría muy bien con el ciclo Gln/Glu porque, de esta forma, estas células dispondrían de una fuente endógena de Glu y amonio. Este Glu endógeno no-sináptico podría ser transformado en  $\alpha$ -KG por transaminación o a través de la reacción de la GDH y, posteriormente, ser incorporado al TCA para satisfacer las necesidades energéticas del astrocito (Fig. 48). De esta forma, los astrocitos no necesitarían utilizar de forma significativa el Glu sináptico para esos fines, reservándolo para la síntesis de Gln en el citosol y su posterior envío a neuronas. Este mecanismo podría ser de especial importante en periodos de gran actividad sináptica. Además, el amonio generado en las mitocondrias por la glutaminólisis se podría utilizar en la síntesis de Gln en el citosol, suministrando de esta forma una fuente adicional de nitrógeno para convertir Glu en Gln. El Glu endógeno derivado de la actividad GA podría también suministrar el Glu necesario para compensar la alta tasa metabólica de GS, que es incluso mayor que el suministro de Glu mediante el ciclo Gln/Glu (Shen J *et al.*, 1999; Sibson *et al.*, 1997).



**Figura (48). Esquema representativo de la sinapsis tripartita.** Dos principales funciones se pueden relacionar con la presencia de GA en astrocitos. La primera, relacionada con su ubicación tanto en el núcleo neuronal como en núcleos astrocitarios, que podría ejercer un papel en la regulación génica directa o indirecta mediante su actividad catalítica en este orgánulo. La segunda es la regulación de los niveles de Gln/Glu mitocondrial o citosólico. El glutamato exógeno puede entrar al compartimento mitocondrial para ser convertido a  $\alpha$ -KG por actividad GDH o transaminación y posteriormente ser oxidado en el ciclo TCA. La Gln puede entrar al compartimento mitocondrial glial, mediado por el acoplamiento a transportadores no caracterizados (MGC) y el amonio derivado de la actividad catalítica GA en mitocondria podría ser utilizado para la síntesis de Gln en citosol. Tanto GAB como KGA son expresadas en astrocitos. Además, la presencia de GAB y su colocalización con GIP en pies perivasculares sugiere una importante implicación en la regulación del tono vascular (tomado de Márquez *et al.*, 2012).

Como se ha indicado, los astrocitos en cultivo pueden metabolizar tanto Gln como Glu. La Gln oxidada parece proceder principalmente de transaminación de  $\alpha$ KG, bien mediante la actividad alanina aminotransferasa (AAT) (McKenna *et al.*, 1996, 1993) o transaminasas de aminoácidos ramificados (Hutson *et al.*, 1998). Por su parte, el Glu parece ser oxidado principalmente a través de la acción GDH y posterior oxidación de  $\alpha$ KG en el ciclo TCA, con una velocidad de oxidación mitocondrial mayor que la Gln. La oxidación mitocondrial de Gln o Glu requeriría de un transporte de estos aminoácidos al interior de este compartimento, el cual podría tener lugar a través de transportadores específicos de alta afinidad (Fig. 48). El transporte de Gln hacia el interior de la mitocondria proporcionaría Glu y facilitaría su posterior catabolismo con fines bioenergéticos y biosintéticos. Este Glu derivado de la Gln dentro de la matriz

mitocondrial no precisaría de un transportador adicional como el que se requiere para el Glu de procedencia exógena.

Para apoyar los datos de actividad enzimática, procedimos a la cuantificación de los niveles de mRNA de las 4 isoenzimas GA (KGA, GAC, GAB y LGA) en astrocitos aislados de cerebelo de rata. Para evitar fenómenos de inducción de la expresión de estas isoformas, por Gln durante el proceso de purificación se omitió este aminoácido del medio de cultivo. Los resultados de qRT-PCR indicaron una predominancia de transcritos Gls (KGA y GAC) frente a los Gls2 (GAB y LGA); en concreto, del total de transcritos GA valorados cuantitativamente en astrocitos del cerebelo, el 99.3 % correspondió a transcritos Gls, mientras que sólo el 0.70 % fueron transcritos Gls2. Estos resultados son coherentes con unas determinaciones previas de los niveles relativos de mRNA de isoformas GA en astrocitos de rata en cultivo mediante RT-PCR por otros autores (Szeliga *et al.*, 2008), aunque en estos estudios no se distinguió entre las dos isoformas Gls2 (se da la suma de LGA y GAB). La escasa presencia de transcritos Gls2 también es una característica fenotípica exhibida por muchos gliomas malignos humanos, así como por líneas celulares derivadas de ellos (Szeliga *et al.*, 2005). Por lo que respecta a los mensajeros Gls, el transcrito GAC fue el más abundante, lo que es destacable dado que esta isoforma no fue encontrada previamente en cerebro humano, si bien la técnica empleada para su detección fue la transferencia Northern, que evidentemente no posee la sensibilidad de la PCR cuantitativa (Elgadi *et al.*, 1999). Será muy interesante comprobar si en cerebro humano se expresa la isoforma GAC, ya que se ha detectado su sobre-expresión cuando ciertas células se transforman y provocan cáncer, especialmente de colon y pulmón (Márquez *et al.*, 2014).

También en enfermedades neurodegenerativas que van acompañadas de inflamación crónica y daño neuronal se ha encontrado una inducción de la isoforma GAC. Así, por ejemplo, en tejido cerebral post-mortem de pacientes con demencia asociada a infección por el virus de la inmunodeficiencia (HIV-1), se observó un aumento considerable del mRNA de GAC (Zhao *et al.*, 2012), junto con niveles significativamente aumentados de Glu, tanto en el tejido cerebral

como en el suero de estos pacientes (Huang *et al.*, 2011). Es interesante resaltar que los niveles aumentados de mRNA para GAC se correlacionaron positivamente con los niveles de STAT1 (transductor y activador transcripcional que media la respuesta celular a interferones INFs), INF- $\alpha$  e INF- $\beta$  (citoquinas proinflamatorias) (Zhao *et al.*, 2012). Asimismo, la expresión de GAC aumentó de forma significativa tanto en macrófagos como en microglía infectados con HIV-1 (Erdman *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011). Estudios posteriores se han realizado para profundizar acerca de cómo la infección por HIV-1 induce neurotoxicidad y explicar la regulación del gen GLS en la infección mediada por HIV-1. La infección por HIV-1 induce liberación de interferón tipo I (incluyendo los subtipos INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ ). Como consecuencias de esta cascada de transducción de señales, se activan los dímeros STAT que translocan al núcleo y se unen a regiones promotoras de genes concretos en los denominados elementos de respuesta estimulados por la acción de interferón (ISRE) (Zhao *et al.*, 2013). Interesantemente, se ha demostrado que tanto INF- $\alpha$  como la infección por HIV-1 son capaces de regular la expresión de GAC a través de la unión de STAT-1 a la región promotora del gen GLS, provocando un aumento en la expresión de GAC y en la producción de Glu (Zhao *et al.*, 2012). Estos datos poseen una notable repercusión fisiopatológica, dado que niveles incrementados de STAT-1 y de INF tipo I no sólo se han reportado en pacientes con demencia asociada a HIV-1, sino también en otras muchas enfermedades neurodegenerativas (Zhao *et al.*, 2012). Finalmente, habría que destacar que el aumento de la expresión de GA de la microglía y la concomitante elevación en la producción de Glu puede ser responsable de los efectos neurotóxicos observados en el síndrome de Rett, una enfermedad letal desarrollada en niñas y caracterizada por anomalías en dendritas y sinapsis (Maezawa y Jin, 2010). La desregulación de la expresión de GA, no sólo en neuronas sino también en células gliales como la microglía, provoca serios trastornos y enfermedades neurológicas, por lo que son necesarios estudios que clarifiquen el papel que cada isoforma desempeña en cerebro.

Los datos presentados en esta memoria sobre la expresión de GA en células gliales han confirmado y extendido nuestros resultados previos sobre GAB y, además, han demostrado que, aparte de las isoformas GlS2, en astrocitos también se expresan isoenzimas GlS como la KGA. Por consiguiente, otro hecho relevante derivado de los estudios inmunohistoquímicos en cerebro de rata y humano, es la presencia de señal inmunorreactiva tanto GAB como KGA en células gliales, y más concretamente en astrocitos. La señal anti-KGA fue siempre citoplasmática. Sin embargo, el anticuerpo anti-GAB detectó señal tanto nuclear (mayoritaria) como citoplasmática en algunos astrocitos. La inmunotinción KGA fue muy evidente en tejido post-mortem humano, tanto en corteza cerebral como en cerebelo, y aunque no realizamos triples marcajes para confirmar la marca mitocondrial, ésta parece serlo por su aspecto punteado y granular en citosol y por su similitud con la inmunotinción mitocondrial KGA neuronal ampliamente contrastada.

En resumen, nuestros resultados refutan el concepto de una localización exclusivamente neuronal de GA y demuestran su expresión en poblaciones minoritarias y concretas de astrocitos. Esta expresión podría ser un rasgo de una subpoblación de estas células que utiliza la Gln para algún proceso biosintético y que podría ser especialmente prominente en periodos de gran actividad sináptica o quizás en relación con la diferenciación celular. En este sentido, cabría distinguir entre la marca astrocitaria de KGA, presumiblemente mitocondrial, y la marca mayoritariamente nuclear para GAB. Mientras que la primera podría adscribirse a procesos biosintéticos y/o relacionados con la bionérgica celular, la segunda podría estar vinculada a una regulación transcripcional asociada con el programa de diferenciación de ambos tipos celulares.

En cultivos *in vitro* de astrocitos siempre se ha detectado una abundante actividad GA (Kvamme *et al.*, 1982; Yudkoff *et al.*, 1988), aunque estos resultados están muy discutidos pues se ha planteado que la actividad GA no está presente *in vivo*. Se piensa que la actividad GA en cultivos aparece como resultado de la inducción de la enzima al cultivar las células gliales en presencia de Gln

(Erecinska y Silver, 1990). Por esta razón, así como por otros datos conflictivos relativos a la actividad GA medida *in vitro* en cultivos de astrocitos (véase Erecinska y Silver, 1990 para una discusión más detallada), la existencia de actividad GA en astrocitos *in vivo* está fuertemente cuestionada. Sin embargo, nuestros resultados demuestran claramente que los astrocitos expresan los cuatro tipos de transcritos GA y que ciertas poblaciones de astrocitos poseen una actividad GA funcional. Ya habíamos publicado previamente la expresión de isoenzimas Gls2 en astrocitos de rata y su co-localización con la proteína PDZ GIP, tanto en cuerpos celulares como en procesos y pies astrocitarios perivasculares (Olalla *et al.*, 2008). Aunque ese trabajo no incorporaba aún dobles marcajes inmunocitoquímicos para asociar la tinción GA a alguna localización subcelular concreta, en todo caso no detectamos una inmunorreactividad nuclear sino claramente citosólica. En cambio, con los nuevos anticuerpos empleados en esta memoria la marca astrocitaria nuclear de GAB fue muy clara y mayoritaria.

Las investigaciones *in vitro* con células gliales no permiten extraer conclusiones directas relacionadas con su comportamiento *in vivo*. Los estudios en cerebro de mamíferos, concretamente en rata y humano objeto de estudio del presente trabajo, permiten mantener las relaciones morfológicas con las neuronas y con los vasos sanguíneos y un estado de madurez metabólica que en cultivos primarios no se podrían considerar ya que estas relaciones no existe (Erecinska *et al.*, 1990).

Nuestro grupo ya descubrió una localización nuclear de GAB en neuronas (Olalla *et al.*, 2002). Era la primera vez que se describía una localización extra-mitocondrial para una GA de mamíferos. A pesar de ello, la función de GAB en núcleo se ha manifestado muy difícil de establecer, y sólo hasta recientemente no estamos vislumbrando posibles roles de esta isoforma en el núcleo. Aunque poco se conoce acerca de la localización preferencial de GAB en el núcleo celular, su presencia y distribución uniforme en el nucleoplasma, podría indicar una función en procesos de regulación génica. No obstante, nuestro grupo de investigación confirmó que hay actividad GA en fracciones nucleares de cerebro de rata (Olalla *et al.*, 2002), por lo que no podemos descartar que su acción

enzimática sea también necesaria para mediar alguna de sus funciones en el núcleo de células nerviosas de cerebro de mamíferos. Por otra parte, y como discutiremos más adelante, el papel nuclear de GAB podría estar relacionado con diferenciación celular y/o quiescencia, según se desprende de estudios realizados en líneas celulares de cáncer humano. Además, tal y como se apuntó en el apartado 5.1 respecto a los resultados de GAB en núcleo neuronal, nuevas aportaciones sobre expresión de GA en cerebro de mamíferos van orientadas a asignar a las isoenzimas Gls2, funciones asociadas con diferenciación y/o quiescencia celular (Velletri *et al.*, 2013), en un papel claramente opuesto al atribuido a las isoformas Gls en muchos tipos celulares, siempre relacionadas con crecimiento y proliferación (Márquez *et al.*, 2014). Por tanto, y sin descartar otras posibles funciones nucleares que nuestro grupo está actualmente evaluando, la localización nuclear de GAB en poblaciones discretas de neuronas y astrocitos podría adscribirse a una regulación transcripcional asociada a diferenciación.

Por último, hay que mencionar que nuestros resultados apoyan hipótesis planteadas como resultado de estudios *in vitro* y de confirmarse, podrían tener un significado trascendental en numerosas patologías cerebrales que están relacionadas con un desequilibrio en el ciclo Gln/Glu y que comúnmente se manifiesta en una variación en los niveles de Glu extracelular. El mecanismo de cada daño es específico de la patología, pero una gran mayoría conduce al edema celular. Como ejemplo, el mecanismo que desencadena el edema astrocitario inducido por una actividad GA mitocondrial *in vivo*, sería viable bajo condiciones patológicas (hipótesis del caballo de Troya). La actividad enzimática GA, la localización nuclear de GAB y la localización de KGA en poblaciones discretas de astrocitos de cerebro de rata sano así como el papel funcional y fisiológico de este hecho, están aún por esclarecer.

### 5.1.3 Expresión perivascular de GA

Otro resultado de gran interés obtenido en el presente trabajo fue la presencia de actividad GA en la periferia de algunos vasos sanguíneos en hipocampo, estriado, corteza y cerebelo. La localización de GA en estructuras perivasculares en cerebro de rata había sido observada ya con anterioridad empleando otros anticuerpos anti-KGA (Kaneko *et al.*, 1988), así como por estudios de nuestro grupo de investigación mediante una inmunolocalización en pies astrocitarios perivasculares con anticuerpos anti-GAB (Olalla *et al.*, 2008).

Una fuerte inmunorreactividad para GAB y KGA se localizó en cerebro de rata alrededor de algunos vasos sanguíneos intraparenquimales, en la superficie pial de la corteza cerebral y en cerebelo. Para ambas isoformas, este inmunomarcaje perivascular selectivo (más intenso para KGA que para LGA) se asoció con estructuras de aspecto punteado, que podrían corresponderse con terminales sinápticos glutamatérgicos. Además, con ambos anticuerpos, se observó inmunorreactividad en cuerpos celulares neuronales (GAB se concentró a nivel nuclear mientras que KGA lo hizo a nivel citoplasmático) en la proximidad cercana al contorno de los vasos sanguíneos. Por otra parte, la tinción enzimática GA-específica reveló actividad GA perivascular en vasos sanguíneos de la corteza; parte de esta actividad no se asoció con células astrocitarias, sino que su localización indicaba una pertenencia a células endoteliales del vaso y/o a terminaciones nerviosas neuronales.

Es conocido que el Glu es un agente vasoactivo, de hecho, cuando se administra este aminoácido o agonistas de los receptores de Glu tipo NMDA a arteriolas *in situ*, éstas se dilatan y como consecuencia de ello se produce un incremento del flujo sanguíneo (Garthwaite, 1988; Fergus y Lee, 1997). Sin embargo, esta vasodilatación mediada por NMDA no ocurre en vasos sanguíneos cerebrales aislados (Takayasu y Dacey, 1989; Faraci y Breese, 1993), sugiriendo la implicación de intermediarios químicos en los efectos vasculares mediada por la activación de receptores NMDA de Glu. El significado fisiológico de la localización perivascular de GA podría ser el de actuar como una fuente local de Glu y mediar

un efecto vasoactivo (Fig. 48). Esta hipótesis estaría apoyada por evidencias que demuestran la existencia de receptores de Glu en pies astrocitarios perivasculares y en células endoteliales (ver Márquez *et al.*, 2009 y referencias citadas en este artículo).

El óxido nítrico, NO se ha identificado como mediador y modulador vascular que acompaña los procesos de actividad neuronal (Ladecola y Zhang, 1996; Lindauer *et al.*, 1999). Se ha comprobado que el NO de origen neuronal es necesario para la vasodilatación inducida por Glu sobre receptores NMDA. Asimismo, existe un control glutamatérgico del tono microvascular en distintas neuronas GABAérgicas en cerebelo de rata (Rancillac *et al.*, 2006). Los receptores NMDA y no-NMDA están implicados en la dilatación microvascular dependiente de NO inducida por Glu. La estimulación de las vías glutamatérgicas podría alterar el tono de los vasos sanguíneos por la activación de células gliales, en donde se ha confirmado recientemente la liberación de moléculas que inducen vasodilatación o vasoconstricción concomitante con un incremento transitorio de  $Ca^{2+}$  en pies perivasculares (Zonta *et al.*, 2003; Filosa *et al.*, 2004; Mulligan and MacVicar, 2004).

Los astrocitos, además de presentar receptores de Glu ionotrópicos y metabotrópicos (revisado en Nedergaard *et al.*, 2002) expresan diferentes isoformas de la enzima encargada de síntesis de NO (óxido nítrico sintasa, NOS, EC: 1.14.13.39) (Wiencken y Casagrande, 1999;), que se encuentran también reguladas por la concentración de  $Ca^{2+}$ . En consecuencia, estas células son capaces de liberar NO tras la activación por Glu de sus receptores, y ejercer su acción vasoactiva sobre los vasos sanguíneos adyacentes. Los astrocitos no sólo contienen ciclooxigenasa-2 (COX-2; EC 1.14.99.1), sino también la proteína citocromo P450 epoxigenasa (CYP2J2; EC: 1.14.14.1), que metaboliza el ácido araquidónico, dando lugar a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), con fuertes propiedades vasoactivas (Bhardwaj, 2000).

El origen de la invasión perivascular cerebral inmunopositiva para las isoformas GA no ha sido identificada, aunque probablemente sea de origen

intrínseco a partir de neuronas glutamatérgicas locales. Hay que tener en cuenta la presencia de somas inmunorreactivos junto con la red de terminales nerviosos en el contorno de estos vasos, que podrían ser la fuente de esta inervación. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que parte de estos terminales inmunorreactivos procedan de neuronas glutamatérgicas distantes, o incluso de neuronas intrínsecas GABAérgicas, acetilcolinérgicas o dopaminérgicas en las cuales hemos encontrado la presencia de GA (Olalla, 2002) y cuya participación en la regulación de la circulación cerebral ha sido descrita previamente (Krimer *et al.*, 1998)

Esta asociación entre terminales nerviosos que contienen GA, astrocitos y vasos sanguíneos cerebrales podría constituir un elemento base de la hiperemia funcional, definida como el acoplamiento entre un incremento de la actividad neuronal y el flujo sanguíneo cerebral (Rancillac *et al.*, 2006) y plantea la posibilidad de que alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica pudieran modificar la regulación vasomotora y/o la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Fig. 48). Estas observaciones sugieren un control vascular dependiente de la actividad neuronal (Harder *et al.*, 1998) y de la activación de la síntesis de transmisores astrogliales.

### **5.2 Expresión de GA en líneas celulares de cáncer humano**

En la búsqueda de modelos celulares que nos permitieran estudiar la función nuclear y el importe al núcleo de las isoformas Gls2, sin recurrir a cultivos primarios de neuronas, quisimos comprobar si líneas celulares de cáncer humano con expresión regulada del gen GLS2 o, alternativamente, inducidas a experimentar diferenciación celular por incubación con agentes tales como ésteres de forbol (PMA), podían ser modelos válidos para este estudio.

La inmunocitoquímica y el fraccionamiento subcelular, seguido por inmunotransferencia Western empleando anticuerpos GLS2-específicos, nos proporcionaron resultados consistentes en relación con la localización nuclear de la isoenzima GAB. En las células de cáncer examinadas, GAB posee una localización nuclear y mitocondrial, siendo ésta última la más abundante en

células control (*wild-type*). Esta es la primera demostración de una doble localización subcelular, nuclear y mitocondrial, para una isoenzima GA a nivel de células individuales; también es la primera vez que se describe una localización nuclear de GAB en células tumorales humanas. Dado que tanto la inmunocitoquímica como el método bioquímico (fraccionamiento subcelular + inmunotransferencia Western) dependen esencialmente de la calidad de los anticuerpos anti-GAB para establecer la localización nuclear, quisimos confirmar ésta mediante métodos ortogonales que no dependieran directamente de los anticuerpos frente a GAB. Así, la localización nuclear de GAB se confirmó transfectando células de neuroblastoma SHSY-5Y con una construcción que expresa la proteína de fusión c-myc-GAB, y cuya localización mediante marcaje inmunofluorescente confirmó la distribución dual nuclear y citosólica (probablemente mitocondrial). Como la marca citoplasmática enmascaró la nuclear, realizamos una inmunotransferencia Western de núcleos de células SHSY5Y transfectadas con c-myc-GAB y revelada con anticuerpos anti-c-myc. La localización nuclear se corroboró mediante una banda de aprox. 68 kDa que aparece en las fracciones citosólicas y nuclear de las células transfectadas (la banda de aprox. 60 kDa de la proteína c-myc endógena también estuvo también presente). Este resultado nos informa, así mismo, que GAB puede ser translocada al núcleo sin procesamiento proteolítico de su extremo N-terminal, pues la proteína de fusión c-myc-GAB tiene el epítipo c-myc en el extremo N-terminal de GAB. Evidentemente, el resultado no descarta la posibilidad de que una parte de la GAB nuclear sea translocada a este orgánulo en una forma truncada en su extremo amino-terminal, si bien no habría sido revelada en este experimento revelando con anticuerpos anti-c-myc pues dicho epítipo habría desaparecido.

Otra prueba adicional de la translocación al núcleo de GAB (y no basada en anticuerpos frente a esta isoforma GA) la obtuvimos realizando una construcción de la proteína GAB en el vector de expresión pEGFP. En este caso, la proteína de fusión EGFP-GAB lleva unida en el extremo N-terminal de GAB la proteína verde fluorescente (GFP), por lo que fue visible al microscopio de fluorescencia en

células transfectadas con el vector de expresión. De nuevo, y pese a que la eficiencia de la transfección no fue elevada, en células individuales transfectadas podía observarse una clara fluorescencia verde en el núcleo aparte de la detectada en el citosol.

Por otra parte, el acúmulo en núcleo de la proteína GAB aumentó en respuesta a agentes de diferenciación como el PMA, tanto en células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano como en neuroblastoma SHSY-5Y. En este caso, mediante inmunocitoquímica observamos una tinción mitocondrial abundante y una tinción nuclear minoritaria. En estudios previos con células de cáncer humano, demostramos que las proteínas codificadas por *GLS2* podrían estar asociadas con diferenciación celular o con un estado de quiescencia, no proliferativo, mientras que aquéllas codificadas por el gen *GLS* lo están con el crecimiento y la proliferación celular (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). En relación a este punto, hemos demostrado recientemente un cambio significativo en el transcriptoma de células de glioblastoma humano (T98G) después de la sobreexpresión de *GLS2*, correlacionado con un incremento en el nivel de proteína GAB tanto en citoplasma celular como en núcleo, lo que sugiere su probable implicación en la regulación transcripcional (Szeliga *et al.*, 2009). Está bien descrito que las células SHSY-5Y de neuroblastoma humano se diferencian adquiriendo un fenotipo neuronal cuando se tratan con ésteres de forbol como PMA (Wen-Sheng, 2006; Söderholm *et al.*, 2000). Estos compuestos actúan en vías de señalización mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC), tanto en células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano (Wen-Sheng, 2006) como en las de neuroblastoma humano SHSY-5Y (Söderholm *et al.*, 2000). La relación del PMA con la diferenciación celular, y con la fosforilación de proteínas diana en células tumorales, fue determinante para su empleo en nuestros ensayos y así, determinar si este compuesto podía intervenir en el importe al núcleo de la GAB. Se realizaron experimentos de incubación de células tumorales con PMA a partir de las 24 horas de incubación en células de neuroblastoma humano, SHSY-5Y, donde ya se había descrito que el PMA tenía un efecto marcado sobre la parada del crecimiento y su posterior diferenciación (Söderholm *et al.*, 2000). En estas

células, encontramos un aumento considerable en la expresión de GAB nuclear a las 6 horas de incubación con PMA, en comparación con las células control. Así pues, el tratamiento con PMA, cuyo efecto revierte el fenotipo maligno al ralentizar el crecimiento celular e inducir posterior diferenciación por generación de neuritas, aumentó el importe de GAB al núcleo, lo que sugiere que GAB podría estar implicada en los cambios de expresión génica necesarios para conseguir un fenotipo más diferenciado.

La movilización de GAB en respuesta a PMA no es novedosa pues ya fue descrita por nuestro grupo en neutrófilos humanos (Castell *et al.*, 2004). La activación de estos leucocitos se consigue también por estimulación con PMA. La proteína GAB se detectó en neutrófilos no activados en los gránulos secundarios de secreción, adyacentes a la membrana plasmática, y, tras el tratamiento con PMA, fue secretada al medio extracelular. La presencia de la GAB en leucocitos está relacionada con su acción bactericida, a través de la producción de anión superóxido por un mecanismo dependiente de Gln, mientras que su secreción al medio extracelular sugería un papel en la respuesta antiinflamatoria mediante regulación de la producción de interleukina 8 (Castell *et al.*, 2004). Estos datos apuntan a que GAB presenta una localización subcelular específica de cada tipo celular y puede ser movilizada a otros destinos mediante rutas de señalización que implican activación de proteínas quinasas.

Por otra parte, otro hecho que resalta el papel fundamental de *GLS2* en procesos de diferenciación, está avalado por estudios recientes en donde se confirmó que p73, un factor de transcripción miembro de la familia p53, promueve la transcripción de *GLS2* durante la diferenciación neuronal de células de neuroblastoma SHSY-5Y con ácido retinoico (Velletri *et al.*, 2013). La proteína p73 está implicada en varios procesos biológicos, tales como muerte celular, diferenciación, mantenimiento de las células madre neuronales, envejecimiento y metabolismo, a través de la regulación de la expresión génica y de miRNAs (Melino *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que p73 aumenta en paralelo con la diferenciación neuronal y que su expresión ectópica indujo crecimiento de neuritas y expresión de marcadores neuronales en líneas

celulares de neuroblastoma, lo que sugiere que desempeña un papel pro-diferenciador (Agostini *et al.*, 2011,). La sobreexpresión de *GLS2* incrementa el crecimiento de neuritas, mientras que en células con expresión de *GLS2* inhibida (*knockdown*) se manifestó una disminución leve, pero significativa en la extensión de las neuritas inducida por incubación con ácido retinoico de las células SHSY-5Y durante 24h (Velletri *et al.*, 2013). Este leve efecto inhibitorio fue debido, probablemente, a un mecanismo compensatorio por expresión de *GLS1*. Además, la inhibición de la actividad GA en neuronas primarias dio lugar a un daño en la neuritogénesis (Hu *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en esta memoria y los datos anteriormente expuestos, se pueden formular varias hipótesis de trabajo acerca de las funciones de GAB en el núcleo. Primero, GAB podría formar parte de un complejo regulador de la transcripción actuando como co-regulador e implicada en el programa de diferenciación de neuronas y astrocitos. Segundo, el significado de la localización nuclear de GAB puede ser también el de una enzima que controla *in situ* los niveles de Gln/Glu en el nucleoplasma y, de esta forma, regula indirectamente la expresión de genes controlados por el nivel de Gln/Glu. La regulación de la expresión génica por aminoácidos en mamíferos se ha convertido en una importante área de investigación. La Gln funciona como una señal celular y su disponibilidad se ha demostrado que regula la expresión de cierto número de genes (Bungard y McGivan, 2004). Y tercero, la GAB quizás actúe como un verdadero factor de transcripción en núcleo, controlando directamente la expresión de ciertos genes implicados en la diferenciación celular (recordemos su motivo de dedo de Zn).

La idea de una proteína-una función se ha convertido en una formulación demasiado simple, habida cuenta de que se ha demostrado que muchas proteínas parecen desempeñar dos o más funciones distintas. Algunos polipéptidos pueden jugar varios papeles en diferentes momentos y/o lugares, incrementando de esta forma la complejidad de los organismos sin incrementar el número de genes. En los últimos años, el número de proteínas que desempeñan más de un papel en un organismo ha aumentado

considerablemente: ejemplos bien conocidos son la fosfoglucoasa isomerasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Jeffery, 1999). Por tanto, en este estudio, la GA quizás debería ser añadida a la creciente lista de las llamadas “*moonlighting*” proteínas, que son aquéllas con una segunda o tercera función. GAB es una enzima mitocondrial que puede poseer otras funciones en el núcleo, en la superficie celular y en el espacio extracelular.

Los resultados recogidos en esta memoria sobre la localización nuclear de GAB en células tumorales abren nuevas vías de investigación para elucidar nuevas funciones de esta proteína. Sería importante conocer si la localización subcelular de la GAB depende sólo del tipo celular o, además, depende del estado de desarrollo de la célula o bien de la fase del ciclo celular. Resulta imprescindible estudiar también con más profundidad su interacción con proteínas PDZ, como GIP y SNT, para revelar el significado fisiológico de la interacción y su implicación funcional.

### **5.2.1 Localización subnuclear de GAB en células tumorales**

Para intentar elucidar la función nuclear de GAB, planteamos experimentos de localización subnuclear de esta proteína. Si GAB está claramente asociada con un orgánulo subnuclear concreto, esta localización podría ser útil para inferir su función. El núcleo de las células de mamífero es un orgánulo muy compartimentalizado aunque extremadamente dinámico (revisado en Misteli 2001; Spector 2006). Muchas proteínas nucleares están localizadas en distintas estructuras, tales como los *speckles*, *paraspeckles*, nucléolos, cuerpos de Cajal, cuerpos P o *Polycomb* y cuerpos de leucemia promielocítica, que muestran patrones de tinción en forma de puntos o gránulos cuando se analizan por microscopía de inmunofluorescencia (Lamond *et al.*, 1998; Spector 2006).

Sin embargo, el patrón de distribución de GAB en el núcleo de células tumorales no pudo adscribirse a ningún orgánulo subnuclear concreto: no se observó una colocalización clara de GAB con proteínas marcadoras de orgánulos subnucleares. Así, GAB no se asoció con los nuclear *speckles* en células tumorales. Los nuclear *speckles*, también conocidos como agrupaciones

granulares de intercromatina, son dominios nucleares enriquecidos en factores de ajuste (*splicing*) de mRNA precursos, localizados en las regiones de intercromatina del nucleoplasma de las células de mamíferos. Cuando se observan mediante microscopía de inmunofluorescencia, suelen aparecer como 20–50 estructuras de forma irregular que varían en tamaño (Spector y Lamond, 2011). La GAB no se concentra específicamente en los speckles sino que aparece en el nucleoplasma en las células HepG2 y con un aspecto granular, por lo que podría descartarse un rol de GAB en el proceso de ajuste de precursos de mRNA. Ahora bien, dada la naturaleza dinámica de estos orgánulos y el hecho de que sus constituyentes puedan intercambiarse continuamente con el nucleoplasma y con otras localizaciones nucleares, incluyendo sitios activos de transcripción, no podemos descartar completamente la participación de GAB en el procesamiento postranscripcional de los pre-mRNAs.

Seguidamente, intentamos ver colocalización de GAB en el nucléolo mediante el empleo de la proteína fibrilarina, marcadora de este orgánulo. Tampoco observamos un solapamiento nítido en la distribución subnuclear de ambas proteínas, no pudiendo afirmarse que GAB esté confinada o limitada al nucléolo, como sí ocurre en el caso de la fibrilarina. Por el contrario, realizando dobles inmunotinciones fluorescentes para GAB y la proteína demetilasa JMJD5 ambos antígenos se distribuyeron espacialmente a lo largo de todo el nucleoplasma, si bien también aparecieron zonas inmunorreactivas para GAB sin presencia de JMJD5. Por consiguiente, de la microscopía de inmunofluorescencia realizada con marcadores nucleares la conclusión es que no hemos podido confinar la expresión de GAB a un orgánulo subcelular concreto, al menos en las líneas de cáncer humano examinadas, y GAB parece tener una distribución espacial en todo el nucleoplasma celular.

### **5.3 Expresión de la proteína GIP en cerebro de rata**

Las proteínas PDZ normalmente actúan como andamios moleculares formando complejos multiproteicos importantes para la generación de la señalización y la polaridad celular (Alewine *et al.*, 2006). En trabajos previos

habíamos confirmado, mediante estudios inmunocitoquímicos por microscopía electrónica, una amplia distribución de GIP en el citoplasma neuronal, mitocondrias y un marcaje asociado a la envoltura nuclear y membrana plasmática (Olalla *et al.*, 2008). La amplia distribución celular-regional de esta proteína en cerebro confirma que, como proteína PDZ, puede interactuar con un amplio rango de proteínas y desencadenar una gran variedad de procesos biológicos.

Los estudios de localización regional, celular y subcelular de GIP en el cerebro de mamíferos está de acuerdo con la distribución de una proteína PDZ que puede interaccionar con otras proteínas localizadas en la mitocondria, el núcleo y la membrana plasmática. La proteína se expresa abundantemente en astrocitos y neuronas. En astrocitos, GIP y GAB se han localizado en los pies astrocitarios perivasculares que participan en la barrera hemato-encefálica. Hasta el presente, se desconoce la función de GIP en los pies astrocitarios perivasculares, pero su presencia ahí junto con GAB podría indicar su participación en el envío selectivo de GAB a poblaciones específicas de astrocitos que rodean arteriolas y vasos sanguíneos como un mecanismo de regulación vascular, teniendo en cuenta el papel esencial de los astrocitos en la regulación cerebrovascular (Koehler *et al.*, 2006). Podría especularse, por tanto, que GIP contribuye a determinar la localización subcelular de GAB en ciertas regiones cerebrales creando, de esta forma, un mecanismo para el envío de esta isoforma GA o para regular su función en cerebro. No obstante, la relevancia fisiológica de la interacción GAB-GIP en cerebro aún necesita ser clarificada con estudios adicionales.

En relación a su función nuclear, la interacción descrita de GIP con factores de transcripción como  $\beta$ -catenina (Kanamori *et al.*, 2003) podría asignarle una función como corregulador transcripcional. En esta memoria hemos confirmado la expresión de GIP en el núcleo celular mediante inmunotransferencia Western de proteínas solubles de núcleos aislados de cerebro de rata. Los datos suministrados en esta memoria mediante técnicas de microscopía óptica en cerebro de rata, confirman la localización nuclear de esta proteína en neuronas.

Otro dato interesante de nuestros estudios de doble-híbrido en levadura, donde descubrimos la interacción GIP-GAB, es que el cDNA de GIP activa la transcripción cuando se subclona en el vector que posee el dominio de unión al DNA, sin necesidad de complementarse con el dominio de activación de la transcripción, lo que sugiere que puede *per sé* activar la transcripción (Olalla *et al.*, 2001). La capacidad de la proteína GIP de actuar como un factor de transcripción *in vivo* podría estar relacionada, de alguna forma, con la hipótesis sugerida anteriormente en la que se postula que GAB podría funcionar como corregulador de la transcripción. De hecho, ambas proteínas (GIP y GAB) interaccionan específicamente (Olalla *et al.*, 2001), y esta unión es capaz de afectar a la actividad enzimática GA (Aledo *et al.*, 2001).

#### **5.4 Aislamiento y caracterización de proteínas nucleares que interaccionan con GIP**

Para ayudar a elucidar la función nuclear de la proteína PDZ GIP, realizamos un estudio de búsqueda de proteínas que interaccionan con ella empleando una metodología proteómica consistente en la cromatografía de afinidad y espectrometría de masas en trampa de iones con ionización ESI (LC-EM).

El análisis del interactoma nuclear cerebral de GIP requiere de una cuidadosa preparación de las muestras, que permita la obtención de un extracto soluble enriquecido en proteínas nucleares y libres de contaminantes de otros orgánulos subcelulares. Este último requerimiento fue difícil de mantener, debido a que en todas las extracciones de proteínas nucleares siempre observamos una leve contaminación mitocondrial. No obstante, las proteínas mitocondriales identificadas en el motor de búsqueda Mascot fueron minoritarias. Así, mediante la cromatografía de afinidad se aislaron proteínas nucleares de extractos cerebrales totales de rata que se asocian a GIP (positivos), tras eliminar las proteínas que interaccionan de forma inespecífica (falsos positivos) mediante una cromatografía previa con BSA-Sefarosa. En esta primera aproximación al interactoma nuclear y cerebral de GIP nos quisimos centrar en

interacciones fuertes, por lo que en los tres experimentos realizados la unión de las proteínas a GIP en la columna se efectuó a alta fuerza iónica (0.35 M NaCl). Obviamente, somos conscientes de que en esas condiciones perdemos interacciones débiles (transitorias) que también pueden ser relevantes desde un punto de vista funcional. Las proteínas que aparecen como positivos en la Tabla I (véase en resultados, apartado 4.8.2) son exclusivamente aquellas identificadas en un mínimo de dos experimentos de los tres ensayos independientes realizados.

Otro hecho a resaltar es la relativa abundancia de positivos con una masa molecular elevada, pese a que a las condiciones de electroforesis SDS-PAGE 1D utilizadas para preseleccionarlos sólo permiten visualizar proteínas de 120-140 kDa, aproximadamente. Suponemos que durante la preparación de los extractos nucleares, pese a la presencia de inhibidores de proteasas, o en las cromatografías de afinidad, se originaron fragmentos peptídicos conteniendo los dominios de unión a GIP y procedentes de proteínas de elevada masa molecular. Esto explicaría la identificación de positivos con masa molecular muy superior al límite de fraccionamiento del gel SDS-PAGE empleado, así como la menor puntuación obtenida en el motor de búsqueda Mascot para estas proteínas concretas, debido a la menor cobertura de secuencia de los péptidos trípticos generados a partir de los fragmentos proteolíticos.

Para seleccionar los positivos más relevantes fue muy útil el empleo de herramientas bioinformáticas de análisis de interacciones proteína-proteína; estos positivos fueron posteriormente validados por SELDI-TOF e IP con anticuerpos específicos. Un dato relevante adicional fue la ausencia de isoformas GLS2 en nuestro panel de positivos, a pesar de que en esta memoria hemos demostrado que GAB (y/o LGA) está en el núcleo de neuronas y astrocitos; más aún, GAB fue previamente identificada como proteína que interactúa con GIP por nuestro grupo de investigación (Olalla *et al.*, 2001). Esta ausencia probablemente obedece a la escasa abundancia de GAB en el extracto nuclear cerebral, en comparación con otros positivos detectados, combinada con la gran

promiscuidad en la unión mostrada por GIP, una proteína PDZ con una capacidad de asociación muy elevada a múltiples parejas que, de esta forma, podría impedir la unión de GAB a la columna de afinidad de GIP por efectos competitivos o estéricos. La constante de disociación,  $K_d$ , de la interacción fue determinada para la unión de GIP al péptido C-terminal de GAB, y estuvo en el rango de 10-30  $\mu\text{M}$  para residuos individuales de GIP (Banerjee et al., 2008). Esta afinidad moderada entre GAB y GIP puede considerarse como muy adecuada para desempeñar funciones reguladoras (Nguyen *et al.*, 1998). No obstante, la afinidad y especificidad de GIP por la proteína GAB completa ha sido rutinariamente explotada por nuestro grupo para purificar la GAB humana (sobre-expresada en sistemas de baculovirus recombinantes) en un solo paso cromatográfico (Campos-Sandoval *et al.*, 2007).

Las putativas proteínas que interactúan con GIP, identificadas por la metodología proteómica en tándem LC-EM, fueron validadas mediante metodología SELDI-TOF *protein-CHIP*. Esta metodología nos permitió poner a punto el protocolo para las IP a pequeña escala y validar algunos de los positivos identificados en el estudio, mediante la obtención de espectros de masa con picos proteicos a una relación  $m/z$  idéntica, o muy cercana, a las masas teóricas del positivo y de la proteína GIP recombinante humana utilizada como control interno. Esta validación y preselección de positivos fue muy conveniente, debido a que por su gran sensibilidad requiere poca cantidad tanto de extracto nuclear proteico así como de los anticuerpos positivo-específicos.

La tecnología SELDI-TOF MS es una herramienta válida y reproducible para estudiar perfiles de proteínas de muestras comparables. El uso de la técnica combinada con el uso de la tecnología *chips* de proteína, utilizando anticuerpos como dispositivos de captura por afinidad, se ha utilizado con éxito en la detección y cuantificación de diferentes proteínas por EM en complejos de mezclas biológicas (Florian *et al.*, 2004). Además, nos permitió la validación e identificación de varios picos proteicos distintivos en las diferentes muestras. Asimismo, las proteínas identificadas fueron, en su mayoría, de baja masa

molecular. Todos los datos obtenidos mostraron alta reproducibilidad, especificidad y sensibilidad. La validez del análisis de los patrones proteómicos fue confirmada al incluir en los ensayos proteína GIP recombinante humana, cuya masa molecular fue identificada en todas las inmunocapturas donde ésta fue adicionada como control interno. Queda pendiente confirmar la identidad de esos picos identificados en SELDI-TOF (con la  $m/z$  teórica esperada para el positivo en cuestión y la GIP de rata), tras su digestión trípica y mediante la cromatografía líquida y EM con trampa de iones ESI.

Para conseguir una presentación y discusión de los resultados más clara, hemos distribuido los positivos detectados (y algunos posteriormente validados) en cuatro grandes grupos. La discusión la centraremos en las proteínas que se han confirmado mediante inmunoprecipitación y análisis mediante tecnología SELDI-TOF.

#### **GRUPO I: NEUROFILAMENTOS, MEMBRANA/ENVOLTURA NUCLEAR:**

queratina CK-1, queratina CK-5, queratina CK-14,  $\beta$ -Spectrin, Plectin 11, Nestin, **APC,  $\beta$ -COP.**

Las proteínas encontradas en este grupo desempeñan básicamente funciones estructurales, si bien algunas de ellas son consideradas también como proteínas andamio (término inglés *scaffold*), que suministran un soporte al cual pueden unirse múltiples proteínas que participan en rutas de señalización, dando lugar a complejos proteicos multifuncionales. Centraremos la discusión de estos resultados sólo en aquellas proteínas que se han validado mediante co-inmunoprecipitación como interactores de GIP y algunas otras proteínas que podrían ser objeto de estudio en futuros experimentos.

La proteína que vamos a comentar con más detalle de este primer grupo de proteínas estructurales, que pueden tener un papel en los neurofilamentos internos de la envoltura nuclear, es la proteína  $\beta$ -COP, seleccionada para la confirmación de la interacción con GIP mediante inmunocaptura. La envoltura nuclear que encierra el DNA genómico en eucariotas está formada por un doble

sistema de membranas lipídicas denominado envoltura nuclear. El transporte de biomoléculas entre el núcleo y el citoplasma se consigue gracias a los denominados poros nucleares, complejos proteicos formados entre las membranas nucleares externa e interna que actúan a modo de canales para el tráfico de moléculas. Existen miles de complejos macromoleculares del poro nuclear en la envoltura nuclear. Se ha demostrado que proteínas del poro nuclear, denominadas nucleoporinas, interaccionan con varias proteínas del complejo coatómero, entre ellas la  $\beta$ -COP (Liu *et al.*, 2003). Los autores sugieren una relación entre la maquinaria de tráfico vesicular de proteínas ( $\beta$ -COP) y el mecanismo de ruptura de la envoltura nuclear que ocurre durante el ciclo celular de las eucariotas superiores. Por último,  $\beta$ -COP posee determinantes estructurales que explicarían su unión con GIP: así, posee una agrupación de hélices  $\alpha$  enrolladas en torno a un eje común, formando una súper hélice dextrógira conocida como plegamiento tipo-armadillo. Este motivo está presente, por ejemplo, en el factor de transcripción  $\beta$ -catenina, una proteína que se ha demostrado que interacciona con GIP (Kanamori *et al.*, 2003).

#### **GRUPO II: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL:**

**Histona H1.2**, Nucleolin, CASK, BAT-2, Zinc finger protein 219, Hexoquinasa 2, MAGED2, ELP1, NAC-1, Hnrnpa2b, **BRCA-1**, Histona A2/B, Selective LIM binding factor, **APC**, THO complex subunit 5 Homolog y MADD.

En este grupo II hemos clasificado a proteínas aisladas e identificadas que interactúan con GIP y que desempeñan funciones en la regulación de la expresión génica, bien favoreciendo el empaquetamiento de la cromatina en el núcleo celular, bien actuando como factores de transcripción o co-reguladores transcripcionales (activadores o represores) y, por último, participando en el procesamiento de mRNA precursores en el proceso de ajuste (eliminación de intrones y unión de exones) que origina los mRNAs maduros en el núcleo celular.

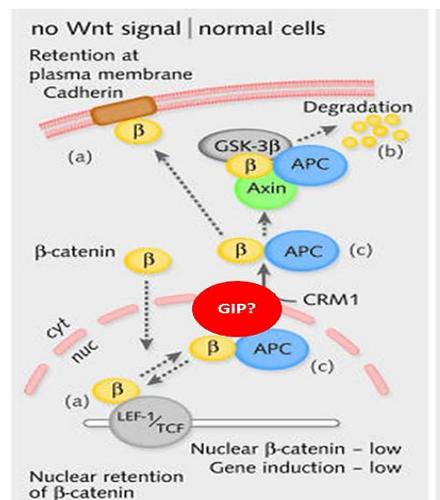
Dado que varios autores han confirmado la función de GIP en la regulación de la expresión génica (véase, por ejemplo, Kanamori *et al.*, 2003; Kanamori *et*

*al.*, 2003), este grupo de positivos puede ser considerado como el que presenta mayores probabilidades de confirmarse como proteínas que realmente se asocian e interactúan con GIP. Esta aseveración se apoya también en los resultados previos de localización subcelular de GIP, que muestran la presencia de esta proteína en núcleo de cerebro de mamíferos (Olalla *et al.*, 2008), hecho que también ha sido confirmado mediante ensayos inmunohistoquímicos en esta memoria.

Estudios recientes han demostrado que APC (*adenomatosis polyposis coli*), una proteína PDZ identificada inicialmente en cáncer de colon, se expresa abundantemente en cerebro y ejerce una importante función en procesos de señalización neuronal (Brakeman *et al.*, 1999). La proteína APC es un supresor tumoral que contiene 7 repeticiones armadillo (ARM) en tándem, importantes para la transducción de señales a través de la ruta de las proteínas Wnt. La proteína APC se une también a filamentos intermedios y es requerida para la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular en astrocitos en cultivo (Sakamoto *et al.*, 2013). Los trabajos publicados por estos autores han demostrado la relación entre la pérdida de expresión de APC y la desorganización de estos filamentos intermedios en gliomas y células cancerosas. En astrocitos migrantes, mediante inmunofluorescencia, se observó que APC colocaliza en microtúbulos con otro de nuestros positivos, la vimentina, no incluida en la Tabla II que resume los positivos más destacados de GIP, debido a la poca puntuación obtenida para esta proteína en el motor de búsqueda Mascot. El rol de la proteína APC permite sugerir que GIP pudiera participar en la reorganización de filamentos intermedios. La proteína APC puede formar co-polímeros, tanto *in vivo* como *in vitro*, cuando se combina con las proteínas que forman parte de los filamentos intermedios tipo II, como la vimentina.

La proteína APC posee dos señales de importe nuclear y dominios estructurales adicionales que facilitan este importe. Entre otras funciones, la proteína APC se opone a los efectos transcripcionales mediados por  $\beta$ -catenina. Este control de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina por APC,

probablemente se produce facilitando su degradación citosólica o mediante su secuestro en el núcleo, lo que impediría la expresión de genes estimulados por Wnt (Henderson *et al.*, 2002) (véase Fig. 50). Como se ha mencionado anteriormente, trabajos realizados por Mutsumi *et al.* (2003), describieron claramente la interacción entre las proteínas GIP y  $\beta$ -catenina, lo que conduce a una disminución en la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina. Asimismo, ambas proteínas ( $\beta$ -catenina y APC) pueden entrar y salir del núcleo de una manera independiente (Henderson *et al.*, 2002). En esta memoria hemos detectado una interacción entre GIP y APC en el núcleo de células cerebrales. Se podría especular que APC puede inhibir los efectos de  $\beta$ -catenina fortaleciendo su interacción con GIP, lo que conduciría a la represión de genes implicados en proliferación.



**Figura (50). Transporte núcleo-citoplasma de  $\beta$ -catenina mediado por APC.** La proteína APC exporta activamente  $\beta$ -catenina desde el núcleo al citoplasma, donde sus niveles están regulados por degradación. En la figura, se incluye la putativa interacción GIP-APC, que podría promover la inhibición de los efectos transcripcionales de APC/ $\beta$ -catenina e inhibición de la proliferación.

El DNA genómico se empaqueta en el núcleo de las células eucariotas formando la estructura de cromatina. La subunidad fundamental de esta estructura es el nucleosoma, constituido por un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4, dos copias de cada una de ellas) sobre los que se superenrolla el DNA formando dos vueltas de superhélice levógira. Cada nucleosoma se une al siguiente por un fragmento de DNA espaciador de aproximadamente 146 pares de bases, sobre el que se sitúan dos copias de la histona H1 (histonas de unión).

Existen diferentes subtipos de histonas H1, pero todas se caracterizan por su fuerte carácter básico lo que facilita su unión a los grupos fosfodiéster del DNA cargados negativamente a pH fisiológico y, de esta forma, estabilizan de forma notable los estados altamente condensados y empaquetados de las fibras de cromatina. La mayoría de las histonas H1 poseen una estructura tridimensional similar consistente en un dominio globular central, un corto segmento no estructurado en la región N-terminal y una larga cola de aminoácidos básicos (notablemente lisina) en el extremo carboxilo terminal. Esa cola básica C-terminal es la que interacciona con el DNA espaciador. El dominio globular posee un racimo de tres hélices  $\alpha$  que posee una homología estructural con el motivo hélice-giro-hélice presente en las proteínas que unen DNA.

La proteína H1.2 es otro de los positivos relevantes en este grupo. El interés de esta histona H1.2, como proteína de interacción con GIP, radica en el hecho de que las histonas H1 no desempeñan meramente un papel estructural en la cromatina, sino que tienen un papel muy importante en la regulación transcripcional. Evidencias experimentales sugieren que la unión o la disociación reversible de esta histona en los nucleosomas determinarían la accesibilidad del DNA del nucleosoma a la maquinaria transcripcional. Así, una proteína como GIP podría actuar reforzando la unión de la histona H1 a los nucleosomas, ocupando entonces las regiones promotoras de genes concretos y actuando de esta forma como un represor de la transcripción génica. Alternativamente, el desplazamiento de H1 por otra proteína (como GIP) podría dejar accesible la región promotora a determinados factores de transcripción, con lo que se activaría la transcripción en esas regiones concretas de la cromatina. Así, la histona H1 se puede considerar como una puerta hacia las regiones promotoras del DNA, que puede permanecer cerrada o abierta a los factores de transcripción. En este contexto, resulta muy interesante recordar que GIP interacciona en núcleo con el factor de transcripción  $\beta$ -catenina, reduciendo la transcripción de los genes controlados por este factor y, al mismo tiempo, disminuyendo la proliferación de células de cáncer colorrectal (Kanamori *et al.*, 2003).

Por último, resulta pertinente incluir aquí un comentario sobre la especificidad de la unión entre GIP y la histona H1.2. En principio, podemos descartar la unión inespecífica entre ambas, ya que la cromatografía de afinidad se hace a pH 8, condiciones en las que la histona tendrá una fuerte carga positiva y GIP estará con carga neta nula, ya que su punto isoeléctrico es aproximadamente 8.0. Precisamente elegimos ese pH en la cromatografía para, de esta forma, disminuir la unión inespecífica de proteínas por atracciones electrostáticas. Por otra parte, desconocemos los motivos o dominios que pudieran estar implicados en la unión GIP-H1.2. La histona H1.2 está fosforilada, ADP-ribosilada y acetilada en residuos específicos. Estas modificaciones postraduccionales están también relacionadas con el control de la transcripción.

### **GRUPO III: CASCADAS/RUTAS DE SEÑALIZACIÓN:**

Cadherin-2, **APC**, **PLCB4**, **BAT2** y ITPR3

Las proteínas incluidas en este grupo están implicadas en la intercomunicación celular a través de señales de todo tipo (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, etc.) que regulan la proliferación, diferenciación, metabolismo, el comportamiento celular e incluso la muerte celular programada (apoptosis). Cuando estas señales llegan a las células diana, interaccionan con sus respectivos receptores y se produce la activación de rutas específicas de transducción de señales. Seguidamente, las señales son transmitidas en el interior de la célula hasta los puntos en que se regula el metabolismo, la transcripción y traducción de genes, etc., para generar una respuesta adecuada. Cada señal extracelular es transducida a través de múltiples rutas o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante diversas modificaciones tales como la fosforilación, defosforilación y translocación intracelular.

La proteína **PLCB4** fue también seleccionada para la validación por SELDI-TOF. Estos estudios no permitieron observar picos de proteínas representativos a las razones m/z esperadas y, por esta razón, hemos omitido los resultados. No

obstante, no descartamos su la validación como potencial proteína que se asocia con GIP hasta la validación e identificación de positivos que efectuaremos en breve por nano-HPLC y EM ESI, posteriores a la elución de los complejos proteicos formados con anticuerpos anti-PLCB4 en los chips de proteínas. Esta proteína forma parte de una familia de enzimas fosfolipasa C que participan en el metabolismo de los fosfatidilinositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) y las vías calcio-dependientes de la señalización celular relacionadas con lípidos.

Hasta la fecha, no se ha reportado alguna información relacionada con su función en el núcleo celular, si bien, se conoce que la localización intracelular de la isoenzima PLCB4 podría estar regulada circadianamente en hígado de ratón (Klein *et al.*, 2008). Las proteínas “reloj”, una vez en el citoplasma, necesitan dimerizar antes de su translocación nuclear. Aunque esto no parece ser necesario para PLCB4 ya que contiene, en su extensión C-terminal, una secuencia de importe al núcleo.

#### **GRUPO IV: FORMACIÓN Y TRÁFICO DE VESÍCULAS DE TRANSPORTE:**

##### **PICCOLO, RABPHILIN-11, Synaptotagmin-17, $\beta$ -COP, KIFC1 y BASSOON**

El protocolo generalmente usado para el aislamiento de núcleos intactos se basa en su fraccionamiento con sacarosa 2.3 M. Normalmente, la alta viscosidad del medio tiene como consecuencia que las partículas sedimenten muy despacio, por lo que se requieren altas velocidades de centrifugación y tiempos prolongados de ésta. Estos protocolos son susceptibles de contaminación por otros orgánulos subcelulares como mitocondrias y retículo endoplasmático (RE). Durante el aislamiento de la fracción nuclear, algunas vesículas del RE podrían adherirse a la superficie del núcleo (Wilkie *et al.*, 2011). Esta última contaminación podría deberse a la continuidad de este orgánulo con la membrana nuclear externa (ONM) (Callan *et al.*, 1950). En nuestro caso, sólo detectamos una leve contaminación mitocondrial en los núcleos aislados mediante inmunotransferencia Western con anticuerpos específicos de proteínas mitocondriales. Aunque fueron muy pocas las proteínas mitocondriales

identificadas en el análisis por EM. Las mitocondrias también pueden adherirse a la superficie de la envoltura nuclear, pese a que la mayoría de ellas deberían ser teóricamente removidas mediante la homogenización Dounce y la separación posterior en un gradiente de sacarosa, donde la mayoría de membranas contaminantes flotan. En los procedimientos para aislar mitocondrias se ha detectado frecuentemente contaminación por sinaptosomas; de esta forma, la existencia de una mínima contaminación mitocondrial en los extractos nucleares, podría conllevar una contaminación adicional por vesículas debido a la presencia de sinaptosomas (Grahamm, 2001) y/o RE (Gavin *et al.*, 2011). No obstante, este hecho parece poco probable debido a que su coeficiente de sedimentación ( $10^2$ - $10^4$  S) es mucho menor que los coeficientes de sedimentación de orgánulos nucleares ( $10^6$ - $10^7$  S) y el de mitocondrias ( $10^4$ - $10^5$  S). De no haber contaminación por vesículas, estaríamos reportando, por primera vez, una localización nuclear de proteínas como Bassoon.

Se han propuesto tres mecanismos para el tráfico de proteínas al núcleo celular y que participan activamente en el proceso de remodelado de la envoltura nuclear: la difusión lateral en la cara externa de la membrana nuclear, el clásico transporte de proteínas mediado por el complejo de proteínas del poro nuclear y la fusión de vesículas desde la ONM/RE con la membrana nuclear interna (Poonam *et al.*, 2009). Este último mecanismo precisa proteínas que están involucradas en la formación y tráfico de vesículas de transporte (Barona *et al.*, 2005). Un hecho que complica este último mecanismo de transporte nuclear es la masa molecular de algunas proteínas: aunque no se conoce bien el límite en tamaño de las proteínas que son transportadas por este sistema, aquéllas que contengan una masa molecular elevada podrían no acceder a la membrana nuclear interna incluso teniendo señales de importe nuclear (Wu *et al.*, 2002).

En cerebro, el mecanismo de liberación de neurotransmisores en las zonas de contacto entre neuronas (sinapsis) está basado en la exocitosis de vesículas sinápticas (SV) disparada por un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$ . Las vesículas sinápticas se acumulan en unos sofisticados compartimientos neuronales denominados botones presinápticos diseñados para la liberación

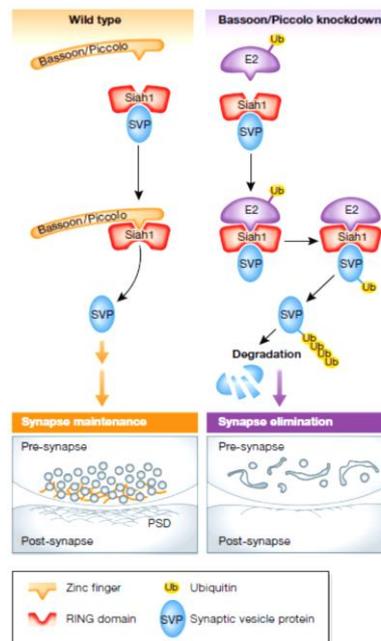
rápida y regulada de neurotransmisores. La fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática de la neurona presináptica está bajo un estricto control espacio-temporal, ya que las vesículas únicamente se unen, fusionan y liberan neurotransmisores en un área restringida y altamente especializada de la membrana plasmática presináptica denominada zona activa (AZ). La AZ está estrechamente asociada a una matriz del citoesqueleto. Hasta la fecha, se han caracterizado cinco familias de proteínas cuyos miembros están particularmente enriquecidos en la zona activa: Munc13, RIM, ELKS, Piccolo y Bassoon (Schoch y Gundelfinger, 2006).

Bassoon es una proteína altamente fosforilada e involucrada en la arquitectura molecular de la citomatrix de terminales nerviosos presinápticos, posee una Mr de 400,000, dos dobles dedos de Zn, varios dominios de ovolos entrelazados (*coiled-coil*) y un segmento de poli-Gln (24 y 11 residuos en rata y ratón respectivamente), la mayoría codificados por repeticiones nucleotídicas CAG. La anormal expansión de estas repeticiones CAG/Gln en estos genes/proteínas, como hemos mencionado anteriormente, están relacionados con un gran número de desórdenes clínicos humanos que incluyen a la enfermedad de Huntington's y la ataxia cerebral autosómica que están caracterizadas en procesos neurodegenerativos (Reddy and Housman, 1997).

En cultivo de neuronas hipocámpales, Bassoon colocaliza con la proteína vesicular sináptica sinaptofisina y con Piccolo, un componente de la citomatrix presináptica. A nivel ultra-estructural, Bassoon se ha detectado en terminales axónicos de neuronas hipocámpales, particularmente enriquecido en las zonas activas vecinas. La proteína está involucrada en la organización de la citomatrix en las zonas de liberación de neurotransmisores (Dieck *et al.*, 1998). Aunque se han identificado un número de proteínas involucradas en la fusión de SV y en el proceso de endocitosis, el mecanismo celular que restringe dicha función en AZ está aún por esclarecer. Una apropiada organización de la citomatrix en la zona activa es esencial para una segura liberación de neurotransmisores desde las neuronas presinápticas.

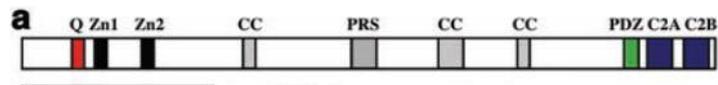
La neurotransmisión en el cerebro depende críticamente del mantenimiento de la sinapsis, así como del mantenimiento del recambio de proteínas sinápticas. Actualmente, se ha comprobado que proteínas de la AZ, como Piccolo y Bassoon, ambas aisladas en nuestros ensayos de interacción con GIP, frenan la tasa de recambio de proteínas presinápticas por restricción de la actividad E3-ubiquitina ligasa de la enzima Siah1, previniendo así procesos neurodegenerativos (Kononenko *et al.*, 2013). La abundancia de proteínas sinápticas es controlada por una cascada de enzimas involucradas en la ubiquitinación de sustratos proteicos y en su posterior degradación.

Trabajos recientes basados en mutaciones hipomórficas en ratones DKO (*doble knockout*) Piccolo/Bassoon-deficientes (exón 14 suprimido), sugieren que ambas proteínas están implicadas en la organización de vesículas sinápticas (Mukherjee *et al.*, 2010). La proteína Piccolo contiene un dominio PDZ, el análisis de su estructura primaria ha revelado que es una proteína multidominio que posee dos motivos dedos de Zn, tres dominios de ovillos entrelazados (*coiled-coil*) y varias regiones ricas en prolina (Fig. 53). No es de extrañar, por tanto, que Piccolo pueda interactuar con una gran cantidad de proteínas (Fenster *et al.*, 2000). Los ratones DKO Piccolo/Bassoon inducen la degradación de proteínas que participan en la formación de cadenas poliubiquitinadas mediante la interacción directa con la actividad E3 ubiquitina ligasa de Siah1 (Waites *et al.*, 2013). Esta interacción, que podría también estar mediada por GIP, sirve como regulador clave del recambio de proteínas sinápticas y el mantenimiento del grupo de proteínas SV.



**Figura (52) Piccolo/Bassoon, reguladores claves del recambio de proteínas sinápticas y control de la sinapsis, restringiendo la actividad de E3 ubiquitina ligasa de Siah1 mediante la unión de su motivo dedo de Zn al dominio Ring de Siah1.** Esta interacción inhibe la maquinaria de ubiquitinación presináptica procurando el mantenimiento de la integridad sináptica. La represión de la expresión de Piccolo/Bassoon dispara la poliubiquitinación y, como consecuencia, la degradación aberrante de proteínas SV, la acumulación de orgánulos degradativos y la posterior eliminación de la sinapsis.

Se ha confirmado la asociación de Bassoon con proteínas como CtBP1 y CAST (Takao-Rikitsu *et al.*, 2004). La proteína CtBP1 es una proteína multifuncional nuclear, involucrada en la fusión de vesículas, que fue originalmente identificada como co-represor transcripcional. Además, esta proteína se ha descrito que se asocia funcionalmente con APC (positivo validado de GIP). Estas interacciones contribuyen a la organización de moléculas en la zona activa neuronal para la liberación de neurotransmisores. Destacar que la expresión y sobreexpresión de Bassoon en células neuronales jóvenes, y no neuronales como COS-7, conduce a la formación de complejos macromoleculares en el citosol (Dresbach *et al.*, 2006) y está implicada en el secuestro e incorporación de CtBP1 desde el núcleo celular a complejos pre-sinápticos en la zona activa (Mini *et al.*, 2008).



**Figura (53): Dominios estructurales de la proteína Piccolo (*Rattus norvegicus*):** Q, siete repeticiones ricas en prolina, Zn, dedos de zinc; PRS, secuencia rica en prolina; CC, dominio de ovillos entrelazados (“coiled-coil”), PDZ, dominio PDZ; y C2, dominio C2.

La proteína  $\beta$ -COP ya fue comentada en el grupo I por su implicación en la formación del poro nuclear. Esta proteína, junto a otras similares, forma el complejo coatómero, un agregado que interviene en el tráfico intracelular de proteínas formando la cubierta de un tipo de vesículas de transporte: las que llevan proteínas desde el RE hasta el aparato de Golgi y de allí hasta su destino final. Es por este motivo que  $\beta$ -COP también se ha incorporado en el grupo IV de proteínas que intervienen en la formación y tráfico de vesículas de transporte. Las vesículas de transporte tienen diferente composición de proteínas en su cubierta, unas están formadas por la proteína clatrina y otras por el complejo coatómero I ó II (COPI y COPII). En concreto,  $\beta$ -COP es una subunidad del coatómero COPI. El tipo de proteínas localizadas en la superficie de la vesícula es muy importante para seleccionar de forma específica la carga proteica que es transportada en la vesícula. Las vesículas COPI participan fundamentalmente en el transporte de proteínas entre los distintos compartimentos del complejo de Golgi y, como vimos en la discusión del grupo I, en la envoltura nuclear. Así pues, proteínas como  $\beta$ -Cop, Bassoon y Piccolo, pese a que no podemos descartar aún que procedan de una contaminación, poco probable por las razones antes comentadas, podrían ser la base de un mecanismo de transporte (importe o exporte) aún no descrito, de proteínas como GAB y/o GIP a otras locaciones celulares como, por ejemplo, el núcleo.



## *Conclusiones*

1) En el presente trabajo se ha confirmado la expresión simultánea en neuronas de isoformas glutaminasa Gls y Gls2 con un patrón diferencial: Gls fundamentalmente en mitocondrias y Gls2 de forma mayoritaria en núcleo. Los estudios inmunohistoquímicos demuestran que estas isoformas se expresan fundamentalmente en regiones cerebrales y tipos celulares asociados con la neurotransmisión glutamatérgica, corroborando el papel de glutaminasa como la principal enzima de síntesis del neurotransmisor excitador glutamato en el cerebro de mamíferos. Sin embargo, la glutaminasa no puede ser considerada como un marcador exclusivo de neuronas glutamatérgicas, ya que las dos isoformas de esta enzima han sido encontradas también en neuronas pertenecientes al sistema inhibitor GABAérgico.

2) Hemos determinado, por primera vez, la existencia de isoformas glutaminasa Gls y Gls2 en células gliales astrocitarias, a nivel de mRNA mediante transferencias RT-PCR cuantitativa, y a nivel de proteína mediante transferencias *Western* y con técnicas inmunocitoquímicas, utilizando anticuerpos isoforma-específicos. La localización subcelular de ambas isoformas en astrocitos fue similar a la encontrada en neuronas. Así mismo, hemos demostrado que en poblaciones discretas de astrocitos la enzima glutaminasa es funcional y posee actividad enzimática. Este hecho constituye un dato importante a tener en cuenta en el papel funcional que ha sido adjudicado a este tipo celular en el ciclo glutamina-glutamato y en la sinapsis tripartita.

3) Las isoformas Gls y Gls2 son expresadas abundantemente por elementos nerviosos localizados en la periferia de algunos vasos sanguíneos cerebrales intraparenquimales. En algunos de estos vasos hemos demostrado actividad enzimática glutaminasa *in situ*. Esto podría constituir el sustrato neuroanatómico del acoplamiento funcional glutamato-vasodilatación.

4) Estudios en líneas celulares de cáncer humano han permitido encontrar una localización dual de isoenzimas Gls2 en mitocondria y núcleo. El acúmulo de Gls2

en núcleo incrementó al inducir la diferenciación de las células de cáncer con ésteres de forbol o en líneas tumorales que sobre-expresan Gls2 y poseen un fenotipo menos transformado que la cepa parental. La localización subnuclear de Gls2 en células de cáncer humano demostró una distribución espacial por todo el nucleoplasma y sin segregación con algún orgánulo subnuclear. La función nuclear de las isoformas Gls2 en líneas celulares de cáncer humano se asoció con la diferenciación celular lo que explicaría la represión de su expresión en muchos tipos de cáncer.

5) Los estudios inmunohistoquímicos en cerebro de mamíferos utilizando un anticuerpo específico para GIP demuestran que esta proteína está presente en neuronas y astrocitos con una localización subcelular múltiple que incluye el núcleo, citoplasma y mitocondria. La localización nuclear de GIP y Gls2 en neuronas y astrocitos constituye un hecho de gran relevancia y plantea nuevas perspectivas en cuanto al papel funcional de estas proteínas en cerebro, particularmente en la regulación transcripcional.

6) La cromatografía de afinidad en tándem con la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas constituye una metodología proteómica muy válida que nos permitió elucidar el interactoma nuclear cerebral de la proteína GIP. Los positivos obtenidos de este análisis se agruparon en bloques funcionales involucrados con el remodelado del citoesqueleto, las rutas de señalización, la regulación de la transcripción y el tráfico y formación de vesículas. Algunos de estos positivos fueron validados por IP y tecnología proteómica Protein-Chip/SELDI-TOF y demuestran que GIP es una proteína multifuncional que podría participar en un gran número de procesos de gran relevancia fisiológica.



## *Apéndice*

## **7. APÉNDICE**

### **1. Medios de cultivo para bacterias**

#### **Medio LB (Luria Bertani)**

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

El pH se ajustó a 7,4 y el volumen a 1 litro. Para hacer medio sólido, se añadieron 16 g/l de agar. A continuación se esterilizó por autoclave.

Cuando se necesitó selección por resistencia a ampicilina, ésta se añadió al medio a una concentración de 50 µg/ml después de la esterilización y cuando la temperatura había descendido a 50 °C como máximo.

#### **Medio 2XYT**

Bactotripton	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g

El pH también se ajustó a 7,4 y el volumen a 1 litro. A continuación se esterilizó por autoclave.

#### **Medio 2XYTA**

Se añadió al medio 2XYT ampicilina a una concentración de 100 mg/ml, después de la esterilización y cuando la temperatura había descendido a 50 °C como máximo.

### **2. Soluciones de carácter general**

#### **Tampón TE pH 8**

Tris-HCl	10 mM (pH 8)
EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mM

### ***Tampón TPBS***

KCl	6,19 mM
NaCl	0,15 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,35 mM
Tween-20	0,1% (v/v)

### ***3. Soluciones para el aislamiento de DNA plasmídico***

#### ***Solución de Lisis***

SDS	1% (p/v)
NaOH	0,2 M

#### ***Solución Neutralizante***

Acetato potásico (5 M)	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Agua	28,5 ml

### ***4. Soluciones para la electroforesis de DNA***

#### ***Tampón TAE 50X (pH 7,2)***

Tris	2 M
Acetato Sódico	1 M
EDTA	50 mM

#### ***Tampón de Carga de DNA 6X***

Sacarosa	25% (p/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xilen Cianol	0,25% (p/v)

## 5. Soluciones para la electroforesis de proteínas y transferencias

### Western

#### **Tampón de Carga de Proteínas 6X**

Glicerol	36% (v/v)
Azul de Bromofenol	0.012% (p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	5% (v/v)
SDS	10% (p/v)
Tris-HCl	350 mM (pH 6,8)

#### **Tampón de Electroforesis 1X**

Tris	0,025 M
Glicina	0,19 M
SDS	0,1% (p/v)

#### **Solución de acrilamida-bisacrilamida:**

acrilamida 29.2% (p/v), bisacrilamida 0.8% (p/v).

#### **Gel concentrador:**

Tris	130 mM pH 6.8
Acrilamida-bisacrilamida	5% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Persulato amónico	0,1% (p/v)
TEMED	0.05% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)

#### **Gel separador:**

Tris	375 mM pH 8.8
Acrilamida-bisacrilamida	10-15% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Persulato amónico	0,1% (p/v)
TEMED	0.05% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)

### ***Solución de Fijado***

2-propanol	25% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

### ***Solución Azul de Coomassie***

Azul de Coomassie R-250	0,25% (p/v)
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

### ***Solución Desteñidora***

Ácido acético	7% (v/v)
Metanol	25% (v/v)

### ***Rojo Ponceau S***

Rojo Ponceau S	0,5 % (p/v)
Ácido acético	1% (v/v)

### ***Tampón de transferencia***

Tris	25 mM
Glicina	190 mM
MeOH	20% (v/v)

## ***6. Soluciones para la purificación de proteínas***

### ***Tampón I (pH 7,4)***

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	10 mM

### ***Tampón de elución (pH 8)***

Tris	50 mM
Glutación	10 mM

reducido

KCl 150 mM

### **7. Soluciones para la purificación de anticuerpos por afinidad**

#### **Tampón de Acoplamiento pH 8,3**

NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M

NaCl 0,5 M

#### **Tampón Acetato pH 4**

Acetato sódico 0,1 M

NaCl 0,5 M

#### **Tampón Tris pH 8**

Tris 0,1 M

NaCl 0,5 M

### **8. Soluciones para técnicas inmunocitoquímicas**

#### **8.1 Soluciones tampón**

##### **Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,4**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 6,9 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 26,7 g

H<sub>2</sub>O hasta 1 litro

##### **Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,4**

PB 0,2 M, pH 7,4 500 ml

H<sub>2</sub>O 500 ml

##### **Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4**

NaCl 9 g

PB 0,1 M, pH 7,4 hasta 1 litro

## **8.2 Soluciones fijadoras**

### ***Paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4***

Paraformaldehído	40 g
PB 0,2 M, pH 7,4	500 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml

El paraformaldehído se disolvió en 400 ml de agua previamente calentada a 60 °C. Se añadieron unas gotas de NaOH concentrado hasta su completa disolución. A continuación se filtró la disolución y se enrasó a 500 ml con H<sub>2</sub>O. Se dejó enfriar y después se añadieron los 500 ml de PB 0,2 M, pH 7,4.

### ***Paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en PB 0,1 M, pH 7,4***

Paraformaldehído	40 g
Glutaraldehído	4 ml
25%(v/v)	
PB 0,2 M, pH 7,4	500 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml

En primer lugar, se preparó la disolución de paraformaldehído como se ha descrito anteriormente. A continuación, se añadió el glutaraldehído.

## **8.3 Crioprotección del tejido**

### ***Sacarosa al 30% en PBS 0,1 M, pH 7,4***

Sacarosa	30 g
Azida sódica	0,2 g
PBS 0,1 M, pH 7,4	hasta 1 litro

#### **8.4 Histología**

##### ***Portaobjetos gelatinados***

Gelatina oro	1 g
Alumbre de cromo y potasio	0,1 g
H <sub>2</sub> O	hasta 200 ml

Los portaobjetos se desengrasaron antes del tratamiento manteniendolos al menos 24 horas en una mezcla de alcohol:éter (1:1). La gelatina se disolvió en agua previamente calentada a 60 °C. A continuación se añadió el alumbre, y una vez disuelto, la solución se filtró. Los portaobjetos se sumergieron en la gelatina caliente durante 15-20 segundos. Después se dejaron secar en una estufa a 37 °C durante 24 horas.

#### **8.5 Microscopía electrónica**

##### ***Recubrimiento de rejillas con 0,5% de formvar en cloroformo***

Formvar	0,5 ml
Cloroformo	99,5 ml

Se recubrió un portaobjetos con una fina película de la solución de formvar y se dejó secar. A continuación se separó la película de formvar del portaobjetos y se depositó sobre H<sub>2</sub>O destilada. Las rejillas de un solo agujero se colocaron sobre la película de formvar y se recogieron con la ayuda de papel de parafina.

##### ***Contrastado de rejillas con 0,25% de citrato de plomo en 0,1 N de NaOH***

Citrato de plomo	50 mg
NaOH	80 mg
H <sub>2</sub> O	100 ml

## 9. Solución para tinción de geles con Ag compatible con EM

### Gel concentrador:

Fijación:	etanol 40% (v/v) ácido acético glacial 10% (v/v).
Sensibilización:	etanol 30% (v/v), tiosulfato sódico 0,2% (p/v), acetato sódico 6.8% (p/v).
Tinción:	nitrate de plata 0.25% (p/v).
Revelador:	carbonato sódico 2.5% (p/v), formaldehido 0.04 % (v/v).
Parada:	EDTA-Na <sub>2</sub> 1.46% (p/v).

## 10. Oligonucleótidos diseñados y utilizados para qRTPCR

TRANSCRITO	SECUENCIA EN SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO	TAMAÑO DEL	
	5'→3'	5'→3'	POSICIÓN	PRODUCTO(PB)/Masa Molar X10 <sup>-4</sup> (g/mol)
rGAB	GCACTCGGACCATGATGCCTCGA	TTGGACCATGCGCTGCATCTTG	246- exón 1 a 435- exón 3	168/11.09
rLGA	ACCAGATGGCCCAAGAGGAG	CGTGGTGAACCTTATGGATGGGG	1 a 212	212/13.99
rKGA	GGCATTCTTTGGACCATTGGAC	CCACCTGTCCTGGGAAGGGGT	1764 a 1863	100/6.6
rGAC	CCTGAGTCAAGTGACGACACGTC	CCTCTCCCCAGACTTCCATTC	1735 a 1799	143/9.4



## *Bibliografía*

- Agostini M, Tucci P, Killick R, Candi E, Sayan BS, Rivetti di Val Cervo P, Nicotera P, McKeon F, Knight RA, Mak TW, et al. Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:21093-8.
- Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* (1996) 271: 2724-2730.
- Akiyama H, Kaneko T, Mizuno N, McGeer PL. Distribution of phosphate-activated glutaminase in the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* (1990) 297: 239-252.
- Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res.* (2010) 107: 163-224.
- Albrecht J, Dolinska M, Hilgier W, Lipkowski AW, Nowacki J. Modulation of glutamine uptake and phosphate-activated glutaminase activity in rat brain mitochondria by amino acids and their synthetic analogues. *Neurochem.* (2000) 36: 341-7.
- Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepathology* (2006) 44: 788-94.
- Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci.* (2007) 12: 332-43.
- Albrecht J, Wegrzynowicz M. Endogenous neuro-protectants in ammonia toxicity in the central nervous system: facts and hypotheses. *Metab Brain Dis.* (2005) 4: 253-63.
- Aledo JC, Gomez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mammal Genome.* (2000) 11: 1107-10.
- Aledo JC, Gómez-Biedma S, Segura JA, Molina M, Núñez de Castro I, Márquez J. Native polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins: glutaminase detection after in situ specific activity staining. *Electrophoresis.* (1993) 14:88-93.
- Aledo JC, Márquez J. Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *J. Neurosci.* (2008) 86: 281-292.
- Aledo JC, Rosado A, Olalla L, Campos JA, Márquez J. Overexpression purification and characterization of glutaminase-interacting protein, a PDZ-domain protein from human brain. *J. Protein Expr. Purif.* (2001) 23: 411-418.
- Alewine C, Olsen O, Wade JB, Welling PA. TIP-1 has PDZ scaffold antagonist activity. *J Mol Biol Cell.* (2006) 10: 4200-11.
- Altschuler RA, Monaghan DT, Haser WG, Wenthold RJ, Curthoys NP, Cotman CW. Immunocytochemical localization of glutaminase-like and aspartate

aminotransferase-like immunoreactivities in the rat and guinea pig hippocampus. Brain. Res. (1985) 330: 225-233.

Altschuler RA, Wenthold RJ, Schwartz AM, Haser WG, Curthoys NP, Parakkal MH, Fex J. Immunocytochemical localization of glutaminase-like immunoreactivity in the auditory nerve. Brain Res. (1984) 291:173-178.

Amiry-Moghaddam M, Lindland H, Zelenin S, Roberg BA. AQP4 in perivascular end-feet is reduced (arrowhead) and astroglial end-feet width (Kir2.x)-associated Proteins. J. Biol. Chem. (2004) 279: 22331-22346.

Aoki, C. Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. J. Neurosci. (1991) 28: 531-548.

Aoki C, Milner TA, Sheu KF, Blass JP, Pickel VM. Glial glutamate dehydrogenase: Ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. J. Neurosci. Res. (1987) 18: 305-318.

Schousboe A, Bak LK and Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. Front Endocrinol. (2013) 15: 4: 102.

Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. J Neurosci Res. (2001) 66: 981-91.

Bak LK, Sickmann HM, Schousboe A, Waagepetersen HS. Activity of the lactate-alanine shuttle is independent of glutamate-glutamine cycle activity in cerebellar neuronal astrocytic cultures. J Neurosci Res. (2005) 79: 88–96.

Banerjee M, Huang C, Márquez J, Mohanty S. Probing the structure and function of human glutaminase-interacting protein: a possible target for drug design. J. Biochemistry. (2008) 47: 9208-19.

Banerjee M, Zoetewey DL, Ovee M, Mazumder S, Petrenko VA, Samoylova TI, Mohanty S. Specificity and promiscuity in human glutaminase interacting protein recognition: insight from the binding of the internal and C-terminal motif. J. Biochemistry. (2012) 35: 6950-60.

Barona T, Byrne RD, Pettitt TR, Wakelam MJ, Larijani B, Poccia DL. Diacylglycerol induces fusion of nuclear envelope membrane precursor vesicles. J Biol Chem. (2005) 50: 4117-17.

Benjamin AM, Quastel JH. Metabolism of amino acids and ammonia in rat brain cortex slices *in vitro*: a possible role of ammonia in brain function. J Neurochem. (1975) 25: 197-206.

- Benjamin AM. Control of glutaminase activity in rat brain cortex in vitro: influence of glutamate, phosphate, ammonium, calcium and hydrogen ions. *Brain Res.* (1981) 208: 363-77.
- Blanco E, Campos-Sandoval JA, Palomino A, Luque-Rojas MJ, Bilbao A, Suárez J, Márquez J, de Fonseca FR. Cocaine modulates both glutaminase gene expression and glutaminase activity in the brain of cocaine-sensitized mice. *Psychopharmacology.* (2012) 219: 933-44.
- Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology.* (1994) 19: 1437-44.
- Bragg AD. Assembly of a perivascular astrocyte protein scaffold at the mammalian blood-brain barrier is dependent on alpha-syntrophin. *Glia.* (2006) 53: 879-90.
- Brakeman JS1, Gu SH, Wang XB, Dolin G, Baraban JM. Neuronal localization of the Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Neuroscience.* (1999) 91(2): 661-72.
- Broman J, Hassel B, Rinvik E, Ottersen OP. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. In: Ottersen OP, Storm-Mathisen J (eds) *Glutamate*, vol 18. Elsevier Science B.V. (2000) 1-44.
- Bungard CJ, McGivan JD. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cell and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem. J.* 2004. 279: 27-32.
- Buschdorf JP, Li Chew L, Zhang B, Cao Q, Liang FY, Liou YC, Zhou YT, Low BC. Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J Cell Sci.* (2006) 119: 3337-50.
- Callan HG, and Tomlin SG. Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* (1950) 137: 367-378.
- Campos-Sandoval JA, López de la Oliva AR, Lobo C, Segura JA, Matés JM, Alonso FJ, Márquez J. Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2007) 39: 765-773.
- Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* (2000) 75: 889-907.
- Cassago A, Ferreira AP, Ferreira IM, Fornezari C, Gomes ER, Greene KS, Pereira HM, Garratt RC, Dias SM, Ambrosio AL. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2012) 109: 1092-7.

- Castell L, Vance C, Abbott R, Márquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol. Chem.* (2004) 279: 13305-13310.
- Castell LM, Poortmans JR, Newsholme EA. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? *Eur. J. App. Phys. Occup. Phys.* (1996) 73: 488-490.
- Catania MV, Aronica E, Yankaya B, Troost D. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase variants in reactive astrocytes of amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord. *J. Neurosci.* (2001) 21: RC148.
- Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg.* (2010) 113: 564-70.
- Chang RC, Plesnila N, Ringel F, Grönlinger C, Staub F, Baethmann A. Role of protein kinase C in acidosis induced glial swelling-current understanding. *Acta Neurochir Suppl.* (1997) 70: 225-7.
- Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, DeBerardinis RJ. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108: 8674-9.
- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* (1990) 13: 171-82.
- Chung-Bok MI, Vincent N, Jhala U, Watford M. Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *Biochem. J.* (1997) 324: 193-200.
- Clements JR, Toth DD, Highfield DA, Grant SJ. Glutamate-like immunoreactivity is present within cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1991) 295: 127-42.
- Cole JT, Sweatt AJ, Hutson SM. Expression of mitochondrial branched-chain aminotransferase and  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase in rat brain: implications for neurotransmitter metabolism. *Front Neuroanat.* (2012) 6: 18.
- Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem.* (2002) 277: 14801-11.
- Collin M, Bäckberg M, Ovesjö ML, Fisone G, Edwards RH, Fujiyama F, Meister B. Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. *Eur J Neurosci* (2003) 18: 1265-78.
- Constantino AA, Huang Y, Zhang H, Wood C, Zheng J C. HIV-1 clade B and C isolates exhibit differential replication: relevance to macrophage-mediated neurotoxicity. *Neurotox Res.* (2011) 20: 277-288.

- Conti F, Rustioni A, Petrusz P, Towle AC. Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J Neurosci.* (1987) 7: 1887-1901.
- Córdoba J, Crespín J, Gottstein J, Blei AT. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology.* (1999) 116: 686-93.
- Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjão R, Pithon-Curi TC. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci.* (2007) 12: 344–57.
- Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *J. Nutr.* (1995) 15: 133-59.
- Danbolt, N.C. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol.* (1994) 44: 377-396.
- Darlington, GJ, Ross, SE, MacDougald, OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 30057-30060.
- Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* (2012) 23: 362-9.
- De la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem Int.* (2009) 55: 76-84.
- De Lanerolle NC, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* (2005) 7: 190-203
- Dienel GA. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis. (2013) 63: 244-58.
- Dingledine R, McBain C. Glutamate and aspartate. *Basic Neurochemistry*, 6th edn. 1999: 315-34.
- Docherty, M, Bradford, H.F, Wu, J.Y. Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature.* (1987) 330: 64-66.
- Donoghue JP, Wenthold RJ, Altschuler RA. Localization of glutaminase-like and aspartate aminotransferase-like immunoreactivity in neurons of cerebral neocortex. *J Neurosci.* (1985) 5: 2597-2608.
- Douglas L. Rothman Henk M. De Feyter Paul K. Maciejewski Kevin L. Is there In Vivo Evidence for Amino Acid Shuttles Carrying Ammonia from Neurons to Astrocytes? *Behav Neurochem Res.* (2012) 37: 2597-2612.
- Douglas L. Rothman Henk M. De Feyter Paul K. Maciejewski Kevin L. Behav Neurochem. Is there In Vivo Evidence for Amino Acid Shuttles Carrying Ammonia from Neurons to Astrocytes? *Neurochem Res.* (2012) 37: 2597-2612.

- Dresbach T, Torres V, Wittenmayer N, Altmann WD, Zamorano P, Zuschratter W, Nawrotzki R, Ziv NE, Garner CC, Gundelfinger ED. Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem.* (2006) 9: 6038-47.
- During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* (1993) 341: 1607-10.
- Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99: 10156-61.
- Eid T, Hammer J, Rundén-Pran E, Roberg B, Thomas MJ, Osen K, Davanger S, Laake P, Torgner IA, Lee TS, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Increased expression of phosphate-activated glutaminase in hippocampal neurons in human mesial temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* (2007) 113: 137-152.
- Eid T, Hammer J, Rundén-Pran E, Roberg B, Thomas MJ, Osen K, Davanger S, Laake P, Torgner IA, Lee TS, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Increased expression of phosphate-activated glutaminase in hippocampal neurons in human mesial temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* (2006) 113: 137-52.
- Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Runden-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet.* (2004) 363: 28-37.
- Eid T, Williamson A, Lee T-SW, Petroff OA, de Lanerolle NC. Glutamate and astrocytes Key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Acta Neuropathol.* (2008) 49: 42-52.
- El Hage M, Masson J, Conjard-Duplany A, Ferrier B, Baverel G, Martin G. Brain. Slices from glutaminase-deficient mice metabolize less glutamine: a cellular metabolomic study with carbon 13 NMR. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2012) 32: 816-24.
- Elgadi, K.M, Meguid, R.A, Qian, M, Souba, W.W, Abcouwer, S.F. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics.* (1999) 1: 51-62.
- Erdmann N, Tian C, Huang Y, Zhao J, Herek S, et al. In vitro glutaminase regulation and mechanisms of glutamate generation in HIV-1-infected macrophage. *J. Neurochem.* (2009) 109: 551-561.
- Erdmann N, Zhao J, Lopez AL, Herek S, Curthoys N, et al. Glutamate production by HIV-1 infected human macrophage is blocked by the inhibition of glutaminase. *J. Neurochem.* (2007) 102: 539-549.

- Erecinska M, Nelson D, Nissim I, Daikhin Y, Yudkoff M. Cerebral alanine transport and alanine aminotransferase reaction: Alanine as a source of neuronal glutamate. *J. Neurochem.* (1994) 62: 1953-1964.
- Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *J. Neurobiol.* (1990) 35: 245-296.
- Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia.* (2004 ) 47: 233-40.
- Faraci, F.M., Breese, K.R. Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ. Res.* (1993) 72: 476-480.
- Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci.* (2013) 14: 851-8.
- Felipo V. Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol.* (2006) 12: 7737-43.
- Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ.. The regulation of AMPK beta, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* (2007) 67: 3043-3053.
- Feng Z. Declining p53 function in the aging process: A possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad SciUSA.* (2007) 104: 16633–16638.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC. Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *J Neuron.* (2000) 25: 203-14.
- Fenster SD, Kessels MM, Qualmann B, Chung WJ, Nash J, Gundelfinger ED, Garner CC. Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *J Biol Chem.* (2003) 22: 20268-77.
- Fergus A, Lee KS. Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* (1997) 754: 35-4580.
- Fernstrom JD. Amino acid assessment workshop branched-chain amino acids and brain function. pp. (2005) 4: 1539-1546
- Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* (2006) 6: 423-36.
- Filosa JA, Bonev AD, Nelson MT. Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res.* (2004) 95:e73– e81.

- Fisher RS. Co-localization of glutamic acid decarboxylase and phosphate-activated glutaminase in neurons of lateral reticular nucleus in feline thalamus. *Neurochem Res.* (2007) 32: 177-86.
- Fisher RS. Co-localization of glutamic acid decarboxylase and phosphate-activated glutaminase in neurons of lateral reticular nucleus in feline thalamus. *Neurochem.* (2007) 32: 177-186.
- Florian J Schweigert, Kerstin Wirth and Jens Raila. Characterization of the microheterogeneity of transthyretin in plasma and urine using SELDI-TOF-MS immunoassay. *Proteome Science.* (2004) 2:5.
- Fonnum F. Glutamate a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.* (1984) 42: 1-11.
- Fonseca LL, Monteiro MAR, Alves PM, Carrondo MJ, Santos H. Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia.* (2005) 51: 286-96
- Freund, T.F, Buzsaki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* (1996) 6: 347-470.
- Gadian DG, Williams SR, Bates TE, Kauppinen. NMR spectroscopy: current status and future possibilities. *Acta Neurochir.* (1993) 57: 1-8.
- Gamberino WC, Berkich DA, Lynch CJ, Xu B, LaNoue KF. Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem.* (1997) 69: 2312-25.
- Gao P. Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* (2009) 458: 762-765.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* (1988) 336: 385-388.
- Wilkie GS, Korfali N, Swanson SK, Malik P, Srsen V, Batrakou DG, de las Heras J, Zuleger N, Kerr AR, Florens L, Schirmer EC. Several novel nuclear envelope transmembrane proteins identified in skeletal muscle have cytoskeletal associations. *Mol Cell Proteomics.* (2011 )10:M110.003129.
- Dienel GA. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? *Neurochemistry International.* (2013) 63: 244-258.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* (1999) 112: 761-772.

- Gluck MR, Thomas RG, Davis KL, Haroutunian V. Implications for altered glutamate and GABA metabolism in the dorsolateral prefrontal cortex of aged schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. (2002) 159: 1165-73.
- Gluck MR, Thomas RG, Davis KL, Haroutunian V. Implications for altered glutamate and GABA metabolism in the dorsolateral prefrontal cortex of aged schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. (2002) 159: 1165-73.
- Godfrey S, Kuhlenschmidt T, Curthoys NP. Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate dependent glutaminase. *J Biol Chem*. (1977) 252: 1927-1931.
- Gómez-Fabre PM, Aledo JC, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Núñez de Castro I, Campos JA, Márquez J. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem J* (2000) 345: 365-375.
- Graham JM. Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*. (2001) 3: 4.
- Gruetter R, Seaquist ER, Kim S, Ugurbil K. Localized in vivo <sup>13</sup>C-NMR of glutamate metabolism in the human brain: initial results at 4 tesla. *Dev Neurosci*. (1998) 20: 3808.
- Gulanski BI, De Feyter HM, Page KA, Belfort-De Aguiar R, Mason GF, Rothman DL, Sherwin RS. Increased brain transport and metabolism of acetate in hypoglycemia unawareness. *J Clin Endocrinol Metab*. (2013) 98: 3811-20.
- Hall TR, Wallin R, Reinhart GD, Hutson SM. Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J Biol Chem*. (1993) 268: 3092-3098.
- Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. (2006) 100: 1059-64.
- Hammer J, Alvestad S, Osen KK, Skare O, Sonnewald U, Ottersen OP. Expression of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the latent phase and chronic phase in the kainite model of temporal lobe epilepsy. *Glia*. (2008) 56: 56-68.
- Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte derived vasodilator metabolites. *Stroke*. (1998) 29: 229-34
- Haroutunian V, Dracheva S, Davis KL. Neurobiology of glutamatergic abnormalities in schizophrenia. *Clin Neurosci Res*. (2003) 3: 67-76.
- Hassel B, Bråthe A. Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *J Neurosci*. (2000) 20: 1342-7.

- Hassel, B, Bachelard, H, Jones, P, Fonnum, F, Sonnewald, U. Trafficking of amino acids between neurons and glia in vivo. Effects of inhibition of glial metabolism by fluoroacetate. *J Cereb Blood Flow Metab.* (1997) 17: 1230-1238.
- Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low grade cerebral edema. *J Hepatol.* (2000) 32: 1035-8.
- Haussinger D, Schliess F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci.* (2007) 12: 371-91.
- Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut.* (2008) 57: 1156-1165.
- Beric R, Henderson and Francois Fagotto, Haydon PG. The ins and outs of APC and  $\beta$ -catenin nuclear transport. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* (2001) 2: 185-193.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J. Neurosci.* (1987) 7: 1503-1519.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* (1999) 57: 417-428.
- Hertz L, Peng L, Lai JC. Functional studies in cultured astrocytes. *Methods.* (1998) 16: 293-310.
- Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* (2004) 27: 735-43.
- Hertz L. The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Front Endocrinol.* (2013) 4: 59.
- Hertz L. Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int.* (2004) 45: 285-96.
- Hertz L. Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol.* (1979) 13: 277-323.
- Hill E, Kalloniatis M, Tan SS. Glutamate, GABA and precursor amino acids in adult mouse neocortex: cellular diversity revealed by quantitative immunocytochemistry. *Cereb. Cortex.* (2000) 10: 1132-1142.
- Holten, A.T, Gundersen V. Glutamine as a precursor for transmitter glutamate, aspartate and GABA in the cerebellum: a role for phosphate-activated glutaminase. *J. Neurochem.* (2008) 104: 1032-42.

- Hong CJ, Hsueh YP. CASK associates with glutamate receptor interacting protein and signaling molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006) 351: 771-6.
- Hsia DA, Tepper CG, Pochampalli MR, Hsia EY, Izumiya C, Huerta SB, Wright ME, Chen HW, Kung HJ, Izumiya Y. KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation. (2010) 107: 9671-6.
- Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* (2008 ) 134: 703-7.
- Hu, W, Zhang, C, Wu, R, Sun, Y, Levine, A, Feng, Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *PNAS.* (2010) 107: 7455-7460.
- Huchun L, Masayuki S, Nadine T, Hava KA. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Mol. Cancer Res.* (2010) 8: 407-20.
- Hutson SM, Berkich D, Drown P, Xu B, Aschner M, LaNoueKF. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. *J Neurochem.* (1998) 71: 863-74.
- Huang Y, Zhao L, Jia B, Wu L, Li Y, et al. (2011) Glutaminase dysregulation in HIV-1-infected human microglia mediates neurotoxicity: relevant to HIV-1-associated neurocognitive disorders. *J Neurosci* 31: 15195–15204.
- Hyder F, Patel AB, Gjedde A, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. Neuronal-glial glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2006) 26: 865-877.
- Hydzinski-García MC, Vincent MY, Haskew-Layton RE, Dohare P, Keller RW Jr, Mongin AA, Banderali U. and Roy G. Anion channels for amino-acids in Mdck cells. *Am. J. Physiol.* (1992) 263: C1200-C1207.
- Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M. Keratin attenuates tumor necrosis factor–induced cytotoxicity through association with TRADD. *J. Cell Biology.* (2001) 155: 415-426.
- Jalil MA, Begum L, Contreras L, Pardo B, Iijima M, Li MX, Ramos M, Marmol P, Horiuchi M, Shimotsu K, Nakagawa S, Okubo A, Sameshima M, Isashiki Y, del Arco A, Kobayashi K, Satrustegui J, Saheki T. Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol Chem.* (2005) 280: 31333-9.
- Jang YS, Lee MY, Choi SH, Kim MY, Chin H, Jeong SW, Kim IK, Kwon OJ. Expression of B/K protein in the hippocampus of kainate-induced rat seizure model. *J. Brain Res.* (2004) 2: 203-11.

- Javier Márquez, Mercedes Martín-Rufián, Juan A. Segura, José M. Matés, José A. Campos-Sandoval, Francisco J. Alonso. Brain glutaminases. *BioMolecular Concepts*. (2010) 1: 3-15.
- Javitt DC. Glutamate and schizophrenia phencyclidine, NmethylD-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol*. (2007) 78: 69-108.
- Jeffery, C.J. Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci*. 1999. 24: 8-11.
- Jeremy N. Pulvers and Wieland B. Huttner. Brca1 is required for embryonic development of the mouse cerebral cortex to normal size by preventing apoptosis of early neural progenitors *Development*. (2009) 136: 1859-1868.
- Jiang L, Gulanski BI, De Feyter HM, Weinzimer SA, Pittman B, Guidone E, Koretski J, Harman S, Petrakis IL, Krystal JH, Mason GF. Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. *J Clin Invest*. (2013) 123: 1605-14.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*. (2007) 10: 331-9.
- Kanamori M, Sandy P, Marzinotto S, Benetti R, Kai C, Hayashizaki Y, Schneider C, Suzuki H. The PDZ protein tax-interacting protein-1 inhibits beta-catenin transcriptional activity and growth of colorectal cancer cells. *J. Biol Chem*. (2003) 40: 38758-64.
- Kaneko T, Mizuno N. Immunohistochemical study of glutaminase containing neurons in the cerebral cortex and thalamus of the rat. *J Comp Neurol*. (1998) 267: 590-602.
- Kaneko, T, Akiyama H, Nagatsu I, Mizuno, N. Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res*. (1990) 507: 151-154.
- Kaneko, T, Itoh, K, Shigemoto, R, Mizuno, N. Glutaminase-like immunoreactivity in the lower brainstem and cerebellum of the adult rat. *Neuroscience*. (1989) 32: 79-98.
- Kausalya PJ, Phua DC, Hunziker W. Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell*. (2004) 15: 5503-15.
- Kimelberg H.K. and Mongin A. A. Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology. *Contrib. Nephrol*. (1998) 123: 240-257.
- Kimelberg HK. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia*. (2005) 50: 389-97.
- Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg*. (1995) 83: 1051-9.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*. (2006) 100: 307-17

- Kononenko N, Pechstein A, Haucke V. Synaptic requiem: a duet for Piccolo and Bassoon. *EMBO J.* (2013) 32: 920-2.
- Kononenko N1, Pechstein A, Haucke V. Synaptic requiem: a duet for Piccolo and Bassoon. *EMBO J.* (2013) 32:920-2
- Korhonen, L, Brännvall, K, Skoglösa, Y. and Lindholm, D. Tumor suppressor gene BRCA-1 is expressed by embryonic and adult neural stem cells and involved in cell proliferation. *J. Neurosci. Res.* (2003) 71: 769-776.
- Korutla L, Wang P, Jackson TG, Mackler SA. NAC1, a POZ/BTB protein that functions as a corepressor. *J. Neurochem Int.* (2009) 54: 245-52.
- Kovacevic Z, McGivan JD. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological importance. *J.Physiol.* (1983) 63: 547-605.
- Klein BM, Andrews JB, Bannan BA, Nazario-Toole AE, Jenkins TC, Christensen KD, Oprisan SA, Meyer-Bernstein EL. Phospholipase C beta 4 in mouse hepatocytes: rhythmic expression and cellular distribution. *Comp Hepatol.* (2008) 28:7:8.
- Klein BM, Andrews JB, Bannan BA, Nazario-Toole AE, Jenkins TC, Christensen KD, Oprisan SA, Meyer-Bernstein EL, Bruneau EG, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Increased expression of glutaminase and glutamine synthetase mRNA in the thalamus in schizophrenia. *Schizophr Res.* (2005) 1: 27-34.
- Krimer LS, Muly EC, Williams GV, Goldman-Rakic PS. Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat. Neurosci.* (1998) 1: 286-289.
- Kuffier, S.w, Nicholls, J.G, Martin, A.R. Physiology of neuroglial cells. En *From Neuron to Brain: a cellular approach to the function of the Nervous System.* Sinauer Associates Inc. (1984) 13: 323-360.
- Kuffier, S.w, Nicholls, J.G, Orkand, R.K. Physiological properties of glial cells the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysio.* (1996) 29: 768-787.
- Kuffier, S.w, Potter, D. Glia in the leech central nervous system: Physiological properties and neuron-glia relationship. *Neurophysiol.* (1964) 27: 290-320.
- Künnecke, B. Application of <sup>13</sup>C NMR spectroscopy to metabolic studies on animals. In *Carbon- <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of biological systems.* Academic Press (1995) 159-267.
- Kvamme E, Nissen-Meyer LS, Roberg BA, Torgner IA. Novel form of phosphate activated glutaminase in cultured astrocytes and human neuroblastoma cells, PAG in brain pathology and localization in the mitochondria. *Neurochem Res.* (2008) 33: 1341-5.
- Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. Phosphate activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res.* (2000) 25: 1407-19.

- Kvamme E. Enzymes of cerebral glutamine metabolism in Mammalian Tissues. J Springer-Verlag. (1984) 32-48.
- Kvamme E, Svennevy G, Hertz L, Schousboe A. Properties of phosphate activated glutaminase in astrocytes cultured from mouse brain. *Neurochem Res.* (1982) 7: 761-770.
- Kwon OJ, Gainer H, Wray S, Chin H. Identification of a novel protein containing two C2 domains selectively expressed in the rat brain and kidney. *J FEBS Lett.* (1996) 2: 135-9.
- Wickham L1, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* (1999) 2220–2230.
- Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme E, Ottersen OP. Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience.* (1999) 88: 1137-51.
- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J. Neurochem.* (1995) 65: 871-881.
- Ladecola C, Zhang F. Permissive and obligatory roles of NO in cere-brovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol.* (1996) 271:R990 –R1001.
- Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science.* (1998) 280: 547–553.
- Lanz B, Xin L, Millet P, Gruetter R. In vivo quantification of neuro-glial metabolism and glial glutamate concentration using 1 H-[<sup>13</sup> C] MRS at 14.1T. *J Neurochem.* (2014) 128: 125-39.
- Lavialle M, Aumann G, Anlauf E, Prols F, Arpin M, Derouiche A. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2011) 108: 12915-12919.
- Leal-Ortiz S, Waites CL, Terry-Lorenzo R, Zamorano P, Gundelfinger ED, Garner CC. Piccolo modulation of Synapsin1 a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis. *J. Cell Biol.* (2008) 5: 831-46.
- Lebon V, Petersen KF, Cline GW, Shen J, Mason GF, DufourS, Behar KL, Shulman GI, Rothman DL. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci.* (2002) 22: 1523–31.

- Lehner B, Semple JI, Brown SE, Counsell D, Campbell RD, Sanderson CM. Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *J. Genomics.* (2004) 1: 153-67.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem.* (2004) 279: 19051-63.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2002) 3: 651-62.
- Lichter-Konecki U, Mangin JM, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Gallo V. Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia.* (2008) 56: 365-77.
- Lichter-Konecki U. Profiling of astrocyte properties in the hyperammonaemic brain: Shedding new light on the pathophysiology of the brain damage in hyperammonaemia. *J Inherit Metab Dis.* (2008) 31: 492-502.
- Lieth E, La Noue KF, Berkich D A, Xu B, Ratz M, Taylor C, Hutson SM. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J Neurochem.* (2001) 6: 1712-23.
- Limbach C, Laue MM, Wang X, Hu B, Thiede N, Hultqvist G, Kilimann MW. Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2011) 108: E392-401.
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U. Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* (1999) 277:H799–H811.
- Liu J, Prunuske AJ, Fager AM, Ullman KS. The COPI complex functions in nuclear envelope breakdown and is recruited by the nucleoporin Nup153. *Dev Cell.* (2003) 5: 487-98.
- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *Biochem J.* (2000) 2: 257-61.
- Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen H.S, Schousboe A, He W, Lin JH, HanX, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, Nedergaard M. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci.* (2007) 27: 12255-12266.
- Low BC, Seow KT, Guy GR. Evidence for a novel Cdc42 GAP domain at the carboxyl terminus of BNIP-2. *J Biol Chem.* (2000) 275: 14415-22.

- Maciejewski PK, Rothman DL. Proposed cycles for functional glutamate trafficking in synaptic neurotransmission. *Neurochem Int.* (2008) 52: 809-825.
- Maeshima H, Ohnuma T, Sakai Y, Shibata N, Baba H, Ihara H, Higashi M, Ohkubo T, Nozawa E, Abe S, Ichikawa A, Nakano Y, Utsumi Y, Suzuki T, Arai H. Increased plasma glutamate by antipsychotic medication and its relationship to glutaminase 1 and 2 genotypes in schizophrenia – Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry.* (2007) 31: 1410-8.
- Maezawa I, Jin LW. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci.* (2010) 15: 5346-56.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain. *News Physiol Sci.* (1999) 14: 177-82.
- Mammoto A, Ohtsuka T, Hotta I, Sasaki T, Takai Y. Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling. *J. Biol Chem.* (1999) 36: 25517-24.
- Marcaggi P, Coles JA. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog neurobiol.* (2001) 64: 157-83.
- Schröder MS, Stellmacher A, Romorini S, Marini C, Montenegro-Venegas C, Altmann WD, Gundelfinger ED, Fejtova A. Regulation of Presynaptic Anchoring of the Scaffold Protein Bassoon by Phosphorylation-Dependent Interaction with 14-3-3 Adaptor Proteins. *Plos one.* (2013) 8: e58814.
- Márquez J, Cardona C, Campos-Sandoval JA, Peñalver A, Tosina M, Matés JM, Martín-Rufián M. Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metab Brain Dis.* (2013) 28: 133-7.
- Márquez J, Mercedes Martín-Rufián<sup>1</sup>, Juan A. Segura<sup>1</sup>, José M. Matés<sup>1</sup>, José A. Campos-Sandoval, Francisco J. Alonso. *Brain glutaminases Bio Mol Concepts.* (2010) 3-15.
- Márquez J, Tosina M, de la Rosa V, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Campos-Sandoval JA. New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochem Int.* (2009) 55: 64-70.
- Márquez J, Matés JM, Alonso FJ, Martín-Rufián M, Campos Sandoval JA. *Addiction After Metabolic Reprogramming.* Capítulo de libro: “Tumor Metabolome. Springer, (2014) en prensa.
- Martin MV, Rollins B, Sequeira PA, Mesén A, Byerley W, Stein R, Moon EA, Akil H, Jones EG, Watson SJ, Barchas J, DeLisi LE, Myers RM, Schatzberg A, Bunney WE, Vawter MP. Exon expression in lymphoblastoid cell lines from subjects with schizophrenia before and after glucose deprivation. *BMC Med Genomics.* (2009) 2: 62–79.

- Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, Manzanares E, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Márquez J. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One*. (2012) 7: e38380.
- Masson J, Darmon M, Conjard A, Chuhma N, Ropert N, Thoby-Brisson M, Foutz AS, Parrot S, Miller GM, Jorisch R, Polan J, Hamon M, Hen R, Rayport S. Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J Neurosci*. (2006) 17: 4660-71.
- Massucci FA, Dinuzzo M, Giove F, Maraviglia B, Castillo IP, Marinari E, Martino AD. Energy metabolism and glutamate-glutamine cycle in the brain: a stoichiometric modeling perspective. *BMC Syst Biol*. (2013) 7: 103.
- Mates JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Márquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. (2009) 41: 2051-61.
- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*. (2004) 279:8076-83.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Hopkins IB. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*. (1996) 66: 386-93.
- McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Boatright R, Huang S. Regulation of energy metabolism in synaptic terminals and cultured rat brain astrocytes: differences revealed using aminooxyacetate. *Dev Neurosci*. (1993) 15: 320-9.
- McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*. (2007) 85:347-58.
- McKenna MC. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain. *Neurochem Res*. (2012) 37: 2613-26.
- McKenna MC, Stevenson JH, Huang X, Hopkins IB. Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. *Neurochem. Int*. (2000) 37: 229-241.
- Meertens LM, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA, Capone JP. A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPAR alpha. *EMBO J*. (1998) 17: 6972-8.

- Miaojun Han, Hailun Wang, Hua-Tang Zhang b, Zhaozhong Han. Expression of Tax-interacting protein 1 (TIP-1) facilitates angiogenesis and tumor formation of human glioblastoma cells in nude mice. *Cancer Letters* 328. (2013) 55-64.
- Jose M1, Nair DK, Altmann WD, Dresbach T, Gundelfinger ED, Zuschratter W. Investigating Interactions Mediated by the Presynaptic Protein Bassoon in Living Cells by Foerster's Resonance Energy Transfer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Biophysical Journal*. (2008) 1483–1496.
- Mock B, Kozak C, Seldin MF, Ruff N, D'Hoostelaere L, Szpirer C, Levan G, Seuanez H, O'Brien S, Banner C. A glutaminase (Gls) gene maps to mouse chromosome 1, rat chromosome 9, and human chromosome 2. *Genomics*. (1989) 5: 291-297.
- Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science*. (1998) 281: 1349-52.
- Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron*. (2003) 40: 881-4.
- Mongin AA, Hyzinski-García MC, Vincent MY, Keller RW Jr. Simple method for measuring intracellular activities of glutamine synthetase and glutaminase in glial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. (2011) 301: C814 22.
- Mongin AA. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology*. (2007) (3-4): 183-93.
- Montero F, Baglietto-Vargas D, Moreno-González I, López-Tellez JF, Cuesta-Munoz AL, Gutiérrez A, Aledo JC. Glutaminase activity is confined to the mantle of the islets of Langerhans. *Biochimie*. (2007) 89: 1366-71.
- Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon HB, Ho A, Castillo PE, Liu X, Sudhof TC. Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107: 6504–6509.
- Chuang NN, Huang CC. Interaction of integrin 1 with cytokeratin 1 in neuroblastoma NMB7 cells. *J. Biochemical Society Transactions*. (2007) 35: 1292-1294.
- Nagaraja TN, Brookes N. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol*. (1998) 274: C883-C891.
- Nathanson K, Wooster R & Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nature Genet*. (2001) 7: 552-556.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. (2002) 3: 748-55.
- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) 98: 14108-14113.

- Newcomb R, Sun X, Taylor L, Curthoys N, Giffard RG. Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death. *J Biol Chem.* (1997) 272: 11276-82.
- Newman EA. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science.* (1986) 233: 453-4.
- Nicklas WJ, Zeevalk G, Hyndman A. Interactions between neurons and glia in glutamate/glutamine compartmentation. *Biochem Soc Trans.* (1987) 15: 208-10.
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocytes swelling. *Metab Brain Dis.* (2007) 22: 219-34.
- Norenberg MD, Martínez-Hernández A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* (1979) 161: 303-10.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *J. Brain Res.* (1979) 2: 303-10.
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr.* (2004) 36: 303-7.
- Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckerman RN, and Lim WA. Exploring the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science.* (1998) 282: 2088–2092.
- Olalla L. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga. Tesis Doctoral (2002).
- Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* (2001) 488: 116-22.
- Olalla L, Gutiérrez A, Jiménez AJ, López-Téllez JF, KhaZU, Pérez J, Alonso FJ, de la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Segura JA, Aledo JC, Márquez J. Expression of scaffolding PDZ protein GIP (glutaminase-interacting-protein) in mammalian brain. *J Neurosci Res.* (2008) 86: 281–92
- Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem.* (2002) 277: 38939-44.
- Olalla L, Aledo J.C, Bannenberg G, Márquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* (2001) 488: 116-122.

- Olivieri G, Baysang G, Meier F, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Brockhaus M, Brack C. N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation. *J Neurochem.* (2001) 76: 224-33.
- Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, Mitchell CA. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J.* (2009) 419: 29-49.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp. Neurol.* (1984) 229: 374-392.
- Ouchi T, Monteiro A, August A, Aaronson S & Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998) 95: 2302-2306.
- P. Zhang, Y. Yang, R. Nolo, P.A. Zweidler-McKay, D.P. Hughes. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene* 29. (2010) 2916-2926.
- Palaiologos G, Hertz L, Schousboe A. Evidence that aspartate aminotransferase activity and ketodicarboxylate carrier function are essential for biosynthesis of transmitter glutamate. *J. Neurochem.* (1988) 51: 317-20.
- Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, Garzón M, Llorente-Folch I, Kobayashi K, Saheki T, Cerdan S, Satrústegui J. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2011) 31: 90-101.
- Pardridge WM, Oldendorf WH. Kinetic analysis of blood brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta.* (1975) 401: 128-36.
- Patel A. B, de Graaf R. A, Mason G. F, Rothman D. L, Shulman R. G. and Behar. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2005)15:5588-5593.
- Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, AndreevBV, Avedisova AS, Bardenstein LM, Gurovich IY, MorozovaMA, Mosolov SN, Neznanov NG, Reznik AM, Smulevich AB, Tochilov VA, Johnson BG, Monn JA, SchoeppDD. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach totreat schizophrenia: a randomized phase 2 clinical trial. *NatMed.* (2007) 13: 1102-7.
- Peng L, Hertz L, Huang R, Sonnewald U, Petersen SB, Westergaard N, Larsson O, Schousboe A. Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev Neurosci.* (1993) 15: 367-77.

- Peng L, Swanson RA, Hertz L. Effects of L-glutamate, D-aspartate, and monensin on glycolytic and oxidative glucose metabolism in mouse astrocyte cultures: further evidence that glutamate uptake is metabolically driven by oxidative metabolism. *Neurochem Int.* (2001) 38: 437-443.
- Pentreath VW, Kai-Kai MA. Significance of the potassium signal from neurons to glial cells. *Nature.* (1982) 295: 59-61.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* (2009) 32: 421-31.
- Perera, S. Y, Chen, T. C. and Curthoys, N. P. Biosynthesis and processing of renal mitochondrial glutaminase in cultured proximal tubular epithelial cells and in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 17764-17770.
- Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J. Genomic organization and transcriptional analysis of the human L-glutaminase gene. *J. Biochem.* (2003) 370: 771-84.
- Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *J. Biochem.* (2005) 386: 535-542.
- Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bio essays.* (1997) 19: 469-79.
- Ponting C.P, Phillips C, Davies KE, Blake DJ. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *J Bioessays.* (1997) 19: 469-479.
- Poonam Malik, Nikolaj Zuleger and Eric C. Schirmer. Transport of Inner Nuclear Membrane Proteins. Chapter 9.
- Porter D, Hansen WR, Taylor L, Curthoys NP. Differential expression of multiple glutaminase mRNAs in LLC-PK1-F4 cells. *Am J Physiol.* (1995) 269: F363-373.
- Porter, L.D, Ibrahim, H, Taylor, L, Curthoys, N.P. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol. Genomics.* (2002) 9: 157-166.
- Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, Nederlof PM, Gage FH, Verma IM. BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* (2012) 477: 179-84.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* (2007) 22: 265-275.
- Ramonet D, Rodríguez MJ, Fredriksson K, Bernal F, Mahy N. In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus.* (2004) 14: 586-94.

- Ramos M, del Arco A, Pardo B, Martínez-Serrano A, Martínez-Morales JR, Kobayashi K, Yasuda T, Bogóñez E, Bovolenta P, Saheki T, Satrústegui J. Developmental changes in the Ca<sup>2+</sup>-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Dev Brain Res.* (2003) 143: 33-46.
- Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong XK, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B. Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J Neurosci.* (2006) 26: 6997-7006.
- Rayport S. Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism Relat Disord.* (2001) 7: 261-264.
- Reddy PS, Housman DE. The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol.* (1997) 9:3 64-72.
- Riordan S, Williams R. Treatment of hepatic encephalopathy. *NEJM.* (1997) 337: 473-479.
- Roberg B, Torgner IA, Kvamme E. The orientation of phosphate activated glutaminase in the inner mitochondrial membrane of synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Neurochem Int.* (1995) 27: 367-76.
- Roberts, E. Strategies for identifying sources and sites of formation of GABA-precursor or transmitter glutamate in brain. *Adv Biochem Psychopharmacol.* (1981) 27: 91-102.
- Romero-Gómez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galán JJ, Montoliu C, Baccaro E, Guevara M, Córdoba J, Soriano G, Navarro JM, Martínez-Sierra C, Grande L, Galindo A, Mira E, Mañes S, Ruiz A. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Ann Intern Med.* (2010) 153: 281-8.
- Romero-Gómez M. Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* (2005) 20: 319-25.
- Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL, Shulman RG. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *PhilosTrans R Soc Lond B.* (1999) 354: 1165-77.
- Roy G. Amino-acid current through anion channels in cultured human glial-cells. *J. Membr. Biol.* (1995) 147: 35-44.
- Satrústegui J, Contreras L, Ramos M, Marmol P, del Arco A, Saheki T, Pardo P. Role of aralar1 the mitochondrial transporter of aspartate-glutamate, in brain N-acetylaspartate formation and Ca<sup>2+</sup> signaling in neuronal mitochondria. *J Neurosci Res.* (2007) 85: 3359-66.

- Schirmer, E. C, and Foisner, R. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp. Cell Res.* (2007) 313: 2167-2179
- Schoch S, Gundelfinger ED. Molecular organization of the presynaptic active zone. *J Cell Tissue Res.* (2006) 326: 379-91.
- Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol.* (2013) 4: 102.
- Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E. Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem.* (1979) 32: 943-50.
- Scully R, Livingston DM. In search of the tumour supressor functions of BRCA1 and RCA2. *Nature.* (2000) 408: 429-432.
- Scully, R, Ganesan, S, Vlasakova, K, Chen, J, Socolovsky, M. and Livingston, D. M. . Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol. Cell* (2000) 1093-1099.
- Selvin PR, Loughheed T, Tonks Hoffman M, Park H, Balci H, Blehm BH, Toprak E. Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy (FIONA) of Cy3-DNA under Deoxygenation Conditions. *CSH Protoc.* (2007) pdb. Prot 4868. doi: 10.1101
- Senba, E, Kaneko, T, Mizuno, N, Tohyama, M. Somato-, branchio- and visceromotor neurons contain glutaminase-like immunoreactivity. *Brain Res.* (1991) 26: 85-97.
- Zencir S, Ovee M, Dobson MJ, Banerjee M, Topcu Z, Mohanty S. Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (2011) 411: 792–797.
- Shank RP, Bennett, DJ. 2-Oxoglutarate transport: a potencial mechanism for regulating glutamate and tricarboxylic acid cycle intermediates in neurons. *Neurochem Res.* (1993) 18: 401-410.
- Shank, R.P, Bennett, D.J. 2-Oxoglutarate transport: a potencial mechanism for regulating glutamate and tricarboxylic acid cycle intermediates in neurons. *Neurochem Res.* (1993) 18: 401-410.
- Shapiro RA, Farrell L, Srinivasan M and Curthoys NP. Isolation, characterization, and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J Biol Chem.* (1991) 266: 18792-18796.
- Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* (2005) 62: 2295-2304.
- Shen J, Petersen KF, Behar KL, Brown P, Nixon TW, Maso GF, Petroff OAC, Shulman GI, Shulman RG, Rothman DL. Determination of the rate of the glutamate/glutamine

cycle in the human brain by in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR. Proc Natl Acad Sci. (1999) 96: 8235-40.

Shen J, Sibson NR, Cline G, Behar KL, Rothman DL, Shulman RG.  $^{15}\text{N}$ -NMR spectroscopy study of ammonia transport and glutamine synthesis in the hyperammonemic rat brain. Dev Neurosci. (1998) 20: 434-43.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL and Shulman RG. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. Proc Natl Acad Sci USA. (1998) 316-321.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Behar KL, Rothman DL, Shulman RG. In vivo  $^{13}\text{C}$  NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. Proc Natl Acad Sci USA. (1997) 94: 2699-704.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. Toxicol Pathol. (2011) 39: 115-23.

Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Expression of glutaminase transcripts in the thalamus in schizophrenia. Biol Psychiatry. (2002)

Soderholm H, Olsson AK, Lavenius E, Ronnstrand L, Nanberg E. Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. Cell.Sig. (2000) 13: 95-104.

Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. Cold Spring Harb Perspect Biol. (2011) 3(2).

Steffens M, Huppertz H-J, Zentner J, Chauzit E, Feuerstein TJ. Unchanged glutamine synthetase activity and increased NMDA receptor density in epileptic human neocortex: implications for the pathophysiology of epilepsy. Neurochem Int. (2005) 47: 379-84.

Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. J Neurosci. (1998) 18: 4588-4602.

tom Dieck S, Sanmartí-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kämpf U, Fränzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED. Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. J Cell Biol. (1998) 142(2):499-509.

Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayawa T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53- inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. PNAS. (2010) 107: 7461-7466.

Svenneby G, Tveit B, Kvamme E. Glutaminase from pig renal cortex. II. Activation by inorganic and organic anions. J Biol Chem. (1970) 245: 1878-1882.

Svoboda N, Kerschbaum HH. L-Glutamine-induced apoptosis in microglia is mediated by mitochondrial dysfunction. Eur J Neurosci. (2009) 30: 196-206.

- Szeliga M, et al. Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*. (2009) 57: 1014-1023.
- Szeliga M, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J. Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors. *Neurochem Res*. (2008) 33: 808-13.
- Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Lazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso F, Márquez J, Albrecht J. Transfection with liver-type glutaminase (LGA) cDNA alters gene expression and reduces viability, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*. (2009) 57: 1014-23.
- Szeliga M, Sidoryk M, Matyja E, Kowalczyk P, Albrecht J. Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett*. (2005) 374: 171-3.
- Takanaga H, Mackenzie B, Peng J-B, Hediger MA. Characterization of a branched-chain amino-acid transporter SBAT1 (SLC6A15) that is expressed in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. (2005) 337: 892-900.
- Takao-Rikitsu, E., S. Mochida, E. Inoue, M. Deguchi-Tawarada, M. Inoue, T. Ohtsuka, and Y. Takai. Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J. Cell Biol*. (2004) 164: 301–311
- Takumi Y, Matsubara A, Laake JH, Ramírez-León V, Roberg B, Torgner I, Kvamme E, Usami S, Ottersen OP. Phosphate activated glutaminase is concentrated in mitochondria of sensory hair cells in rat inner ear: a high resolution immunogold study. *J. Neurocytol*. (1999) 28: 223-37.
- Takayasu M, Dacey RG Jr. Effects of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitter on isolated cerebral parenchymal arterioles. *Brain Res*. (1989) 482: 393-396.
- Takumi, Y, Matsubara, A, Rinvik, E, Ottersen, O.P. The arrangement of glutamate receptors in excitatory synapses. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. (1999) 868: 474-482.
- Tang LL, Wang R, Tang XC. Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production. *Eur J Pharmacol*. (2005) 519: 9-15.
- Taylor L, Liu X, Newsome W, Shapiro RA, Srinivasan M, Curthoys NP. Isolation and characterization of the promoter region of the rat kidney-type glutaminase gene. *Biochim Biophys Acta*. (2001) 1518: 132-6.
- Thomas JW, Novelli A, Tao-Cheng JH, Henneberry R, Smith HH, Banner C. Developmental induction of glutaminase in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res*. (1989) 6: 47-54.

- Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* (2005) 11: 973-81.
- Turman JE Jr1, Chandler SH. Immunohistochemical localization of glutamate and glutaminase in guinea pig trigeminal premotoneurons. *Brain Res.* (1994) 634: 49-61.
- Turner A, McGivan JD. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *J. Biochem.* (2003) 370: 403-8.
- Valletri T, Romeo F, Tucci P, Peschiaroli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Niklison-Chirou MV, Amelio I, Knight RA, Mak TW, Melino G, Agostini M. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle.* (2013) 22: 3564-73.
- Van der Gucht E, Jacobs S, Kaneko T, Vandesande F, Arckens L. Distribution and morphological characterization of phosphate-activated glutaminase-immunoreactive neurons in cat visual cortex. *Brain Res.* (2003) 988: 29-42.
- Van Elst LT, Valerius G, Buchert M, Thiel T, Rusch N, Buble, Hennig J, Ebert D, Olbrich HM. Increased prefrontal and hippocampal glutamate concentration in schizophrenia: evidence from a magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry.* (2005) 58: 724-30.
- Vanden Broecke C, Pfeffer LM. Characterization of interferon-alpha binding sites on human cell lines. *J Interferon Res.* (1988) 8: 803-811.
- Vaucher E, Tong XK, Cholet N, Lantin S, Hamel E. GABA neurones provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurones in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J. Comp. Neurol.* (2000) 421: 161-171.
- Velletri T, Romeo F, Tucci P, Peschiaroli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Niklison-Chirou MV, Amelio I, Knight RA, Mak TW, Melino G, Agostini M. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle.* (2013) 12: 3564-73.
- Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage *Journal of Cell Science.* *J Cell Sci.* (2001) 114: 3591-3598.
- Vizi ES, Kiss, J.P. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus.* (1998) 8: 566-607.
- Waagepetersen HS, Qu H, Sonnewald U, Shimamoto K, Schousboe A. Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons. *J Neurochem Int.* (2005) 47: 92-102.

- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem.* (2000) 75: 471-9.
- Waites CL, Leal-Ortiz SA, Okerlund N, Dalke H, Fejtova A, Altmann WD, Gundelfinger ED, Garner CC. Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *EMBO J* (2013) 32: 954-969.
- Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. *J Pharmacol.* (2006) 147: 100-108.
- Waniewski RA, Martin DL. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem.* (1986) 47: 304-13.
- Wiencken AE, Casagrande VA. Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia.* (1999) 26: 280-290.
- Weil-Malherbe H. Modulators of glutaminase activity. *J Neurochem.* (1972) 19: 2257-2267.
- Wen-Sheng, W. Proteina kinase C trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell Hep G2. *Cancer Lett.* (2006) 239: 27-35.
- Wenthold RJ, Skaggs KK, Altschuler RA. Immunocytochemical localization of aspartate aminotransferase and glutaminase immunoreactivities in the cerebellum. *Brain Res.* (1986) 363: 371-375.
- Wilkie GS, Korfali N, Swanson SK, Malik P, Srsen V, Batrakou DG, de las Heras J, Zuleger N, Kerr AR, Florens L, Schirmer EC. Several novel nuclear envelope transmembrane proteins identified in skeletal muscle have cytoskeletal associations. *Mol Cell Proteomics.* (2011) 10: M110-003129.
- Wilkie, G S and Schirmer E C. Purification of nuclei and preparation of nuclear envelopes from skeletal muscle. *Methods Mol. Biol.* (2008) 463: 23-41.
- Willis C, Lybrand S, Bellamy N. Excitatory amino acid inhibitors for traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev.* (2003) 1: CD003986.
- Wilson GM, Roberts EA, Deeley RG. Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J Lipid Res.* (1997) 38: 437-46.
- Wilson KF, Erickson JW, Antonyak MA, Cerione RA. Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends Mol Med.* (2013) 19: 74-82.
- Wood JD, Yuan J, Margolis RL, Colomer V, Duan K, Kushi J, Kaminsky Z, Kleiderlein JJ, Sharp AH, Ross CA. Atrophin-1, the DRPLA gene product, interacts with two families of WW domain-containing proteins. *Mol Cell Neurosci.* (1998) 11: 149-60.
- Wu W, Lin F, Worman HJ. Intracellular trafficking of man1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Cell Sci.* (2002) 115: 1361-71.

- Wurdig S, Kugler P. Histochemistry of glutamate metabolizing enzymes in the rat cerebellar cortex. *Neurosci Lett.* (1991) 130: 165-8.
- Xie L, Yamamoto B, Haoudi A, Semmes OJ, Green PL. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood.* (2006) 107: 1980-8.
- Sakamoto Yasuhisa et al. APC binds intermediate filaments and is required for their reorganization during cell migration. *J Cell Biol.* (2013) 200: 249-58.
- Yadav A, Collman RG. CNS inflammation and macrophage/microglial biology associated with HIV-1 infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* (2009) 4: 430-47.
- Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - The seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* (2008) 65: 3981-99.
- Yuan S, Lee S, Chen G, Song M, Tomlinson G & Lee EY. BRCA2 is required for ionizing radiation induced assembly of Rad 51 complex in vivo. *Cancer Res.* (1999) 59: 3547-355.
- Yuan, S. S, Lee, S. Y, Chen, G, Song, M, Tomlinson, G. E. and Lee, E. Y. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* (1999) 59: 3547-3551.
- Yudkoff M, Nissim I, Pleasure D. Astrocyte metabolism of <sup>15</sup>N-glutamine: implications for the glutamine-glutamate cycle. *J Neurochem.* (1988) 51: 843-50.
- Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* (1997) 21: 92-98.
- Yudkoff, M, Daikhin, Y, Grunstein, L, Nissim, I, Stern, J, Pleasure, D, Nissim, I. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. *J. Neurochem.* (1996) 66: 378-385.
- Zoetewey DL, Ovee M, Banerjee M, Bhaskaran R, Mohanty S. Promiscuous Binding at the Crossroads of Numerous Cancer Pathways: Insight from the Binding of GIP with Glutaminase. *L. Biochemistry.* (2011) 50: 3528–3539.
- Zoetewey DL, Ovee M, Banerjee M, Bhaskaran R and Mohanty S. Glutamate uptake - Review. *Prog. Neurobiol.* (2001) 65: 1-105.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* (2003)6:43–50.
- Zhao Lixia, Yunlong Huang, Changhai Tian, Lynn Taylor, Norman Curthoys, Yi Wang, Hamilton Vernon, Jialin Zheng. Interferon- $\alpha$  Regulates Glutaminase 1 Promoter through STAT1 Phosphorylation: Relevance to HIV-1 Associated Neurocognitive Disorders. *Plos One.* (2012) 7(3): e32995.

Zhao L1, Huang Y, Zheng J. STAT1 regulates human glutaminase 1 promoter activity through multiple binding sites in HIV-1 infected macrophages. PLoS One. (2013) 24:8.

Zencir S, Banerjee M, Dobson MJ, Ayaydin F, Fodor EA, Topcu Z, Mohanty S. New partner proteins containing novel internal recognition motif for human glutaminase interacting protein (hGIP). Biochem Biophys Res Commun. (2013) 432: 10-5.

Zencir, M. Ovee, M.J. Dobson, M. Banerjee, Z. Topcu, S. Mohanty. Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2011) 792-797.

Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity Oncogene. (1998) 16: 1713-1721.